



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Química e Ingeniería Química**

**Escuela Profesional de Química**

**Síntesis, caracterización y evaluación de la actividad  
antimicrobiana contra E. coli de las nanopartículas de  
plata funcionalizadas acopladas al péptido VIHGW-  
alquino-G-NH<sub>2</sub>**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico

**AUTOR**

Miguel Roberto GAKIYA TERUYA

**ASESOR**

Julio SANTIAGO CONTRERAS

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Gakiya, M. (2019). *Síntesis, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana contra E. coli de las nanopartículas de plata funcionalizadas acopladas al péptido VIHGW-alquino-G-NH<sub>2</sub>*. Tesis para optar el título profesional de Químico. Escuela Profesional de Química, Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

CODIGO ORCID DEL AUTOR: 0000-0001-9656-9477

CODIGO ORCID DEL ASESOR: 0000-0002-1905-7029

DNI DEL AUTOR: 47310070

GRUPO DE INVESTIGACIÓN: Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Química Orgánica (LIDQO)

INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN:  
CONCYTEC/FONDECYT

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN: Jr. Medrano Silva 165,  
Barranco 15063. Lima, Perú

AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ: 2 años



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA**

Central: 619 7000 anexos 1230 Telefax: 1209  
Ciudad Universitaria – Calle Germán Amezaga 375 – Lima 1  
“Año de la lucha contra la Corrupción y la Impunidad”

**ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA**

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los suscritos miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Química, bajo la Presidencia del **Dr. NELSON JUVENAL TAPIA HUANAMBAL** (Presidente), el **Quím. ALDO JAVIER GUZMÁN DUXTAN** (Miembro) y el **Dr. JULIO CÉSAR SANTIAGO CONTRERAS** (Asesor), habiendo presentado para tal efecto la **TESIS**, titulada “**Síntesis, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana contra *E. Coli* de las nanopartículas de plata funcionalizadas acopladas al péptido VIHGW-alquino-G-NH<sub>2</sub>**”, después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la **TESIS** elaborado por el Bachiller en Química: **MIGUEL ROBERTO GAKIYA TERUYA**; para optar el **TÍTULO PROFESIONAL de QUÍMICO**, acordaron calificarlo con la **NOTA** de:

Diecisiete

(LETRA)

17

(NÚMERO)

Ciudad Universitaria, 12 de julio de 2019.

**Dr. NELSON JUVENAL TAPIA HUANAMBAL**  
PRESIDENTE

**Quím. ALDO JAVIER GUZMÁN DUXTAN**  
MIEMBRO

**Dr. JULIO CÉSAR SANTIAGO CONTRERAS**  
ASESOR

**Dra. THAIS CLEOFÉ LINARES FUENTES**  
DIRECTORA (e) DE LA E.P. DE QUÍMICA



## **Dedicatoria**

ii

Dedico este trabajo a toda mi familia y amigos que estuvieron siempre apoyándome en los momentos más difíciles. Especialmente a mi madre ya que gracias a ella cada día me siento motivado para seguir cada uno de mis sueños.

Agradezco a FONDECYT - Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (Número de contrato 155-2015), por todo el financiamiento brindado para el desarrollo del proyecto.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en especial a la facultada de química e ingeniería química (EAP Química), por ser la institución que me brindó una educación de calidad.

A la Universidad de Ingeniería y Tecnología – UTEC, por permitirme trabajar y hacer mis prácticas profesionales en sus instalaciones.

A Lerner Research Institute - Cleveland Clinic, por brindarme la oportunidad de hacer una pasantía en sus laboratorios.

Al Dr. Juan Carlos Rodríguez Reyes, por asesorarme durante toda mi tesis y brindarme sus conocimientos y enseñanzas. También por motivarme en cada momento difícil de la tesis.

Al Dr. Julio Santiago Contreras, por ayudarme en la asesoría de mi tesis y aconsejarme con sus conocimientos.

Al Dr. Vijay Krishna, por permitirme trabajar en su laboratorio durante mi pasantía en Lerner Research Institute - Cleveland Clinic. Además, por continuar brindándome sus conocimientos.

Al Dr. Alfredo Angeles Boza, por brindarme el péptido sintético VIHGW-alquino-G-NH<sub>2</sub> y iv  
apoyarme con sus conocimientos en las pruebas antimicrobianas.

A Karinna Visurraga y Luz Pérez (UTEC), por su apoyo administrativo y técnico.

A Mitzy Cerna Alzamora, por su apoyo incondicional durante mi etapa universitaria y la  
realización de la tesis.

A Luis Palomino Marcelo, mi compañero de laboratorio, por su apoyo incondicional durante la  
realización de la tesis. Así mismo por bríndame sus consejos y conocimientos en el laboratorio.

A mi familia, pero especialmente a mi madre por guiarme en el transcurso de toda mi vida y  
siempre estar motivándome para que siga cada uno de mis sueños, por su apoyo incondicional en  
los momentos más difíciles y principalmente por todo el amor y enseñanzas que me ha brindado  
durante toda mi vida.



## Lista Símbolos y Abreviaciones

Ácido Ascórbico	<b>AA</b>
Péptido sintético VIHGW-alkyne-G-NH <sub>2</sub>	<b>VIH</b>
Tiol-polietilenglicol-azida	<b>SH-PEG-N<sub>3</sub></b>
Unidad de colonias formadoras por mililitro	<b>CFU/mL</b>
Nanopartícula	<b>NP</b>
Nanopartículas	<b>NPs</b>
Nanopartículas de plata	<b>AgNPs</b>
Nanopartículas de oro	<b>AuNPs</b>
Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X	<b>XPS</b>
Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier	<b>FTIR</b>
Infrarrojo	<b>IR</b>
Dispersión de Luz Dinámica	<b>DLS</b>
Reflexión Total Atenuada	<b>ATR</b>
Ultravioleta-Visible	<b>UV-Vis</b>
Buffer fosfato	<b>PB</b>
Medio Luria-Bertani	<b>Medio LB</b>
Microscopio electrónico de transmisión	<b>TEM</b>
Resonancia de plasmones superficiales	<b>SPR</b>
Electronvoltio	<b>eV</b>
Tiol	<b>SH</b>
Azida	<b>N<sub>3</sub></b>
Nanopartículas de plata funcionalizadas	<b>AgNPs-S-PEG-N<sub>3</sub></b>
Nanopartículas de plata funcionalizadas acopladas al péptido	<b>AgNPs-S-PEG-VIH</b>
Potencial zeta	<b>ZP</b>
Buffer fosfato salino	<b>PBS</b>
La Anchura a media altura	<b>FWHM</b>
Enlace amino terminal a Cu(II) y Ni(II)	<b>ATCUN</b>

Revoluciones por minuto	<b>RPM</b>
Especies de oxígeno reactivos	<b>ROS</b>
Shai-Matsuzaki-Huang	<b>SMH</b>
Unidad de formación de Colonia	<b>UFC</b>
Luria Bertani	<b>LB</b>
1-etil-3-(3 dimetilaminopropil) carbodiimide	<b>EDC</b>
oligo etilenglicol	<b>OEG</b>
N -hidroxil-succinimida	<b>NHS</b>

## Tabla de Contenidos

Capítulo 1 Introducción .....	1
Definición de nanotecnología.. .....	1
Aplicación de la nanotecnología en medicina (nanomedicina). .....	2
Diagnóstico médico. ....	2
Nanofarmacos. ....	3
Medicina regenerativa.....	3
Nanomateriales antibacterianos .....	4
Agentes antibacteriales: Desafíos y oportunidades.....	5
Costos e impacto social de las bacterias multirresistentes.....	5
Agentes antibacteriales. ....	7
Péptidos antibacteriales.....	7
Nanopartículas metálicas .....	10
Nanopartículas metálicas .....	13
Síntesis .....	13
Métodos físicos. ....	13
Métodos biológicos.....	14
Métodos químicos.....	14
Interacción directa.....	16
Interacción indirecta.....	17
Funcionalización de nanopartículas metálicas.....	18
Acoplamiento de biomoléculas activas con nanopartículas metálicas .....	19
Acoplamiento carbodiimina.....	19
Reacción Click de Huisgen .....	20
Técnicas de caracterización .....	22
Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) .....	22
Espectroscopía infrarroja por reflexión total atenuada (ATR-IR) .....	24
Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis) .....	25
Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial zeta (ZP) .....	27
Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) .....	30
Microscopio electrónico de transmisión (TEM) .....	32
Capítulo 2 Objetivos .....	34
Objetivo General .....	34
Objetivos Específicos.....	34
Capítulo 3 Parte Experimental .....	35
Materiales y equipos .....	35
Reactivos.....	35
Metodología .....	37
Síntesis de AgNPs .....	37

	viii
Funcionalización de las AgNPs.....	38
Acoplamiento del péptido con las AgNPs.....	39
Ensayos antimicrobianos.....	40
Purificación de <i>E. coli</i> .....	41
Caracterización.....	41
Capítulo 4 Discusión de Resultados .....	43
Capítulo 5 Conclusiones .....	56
Referencias Bibliográficas .....	57
Anexo .....	64
Calculo de la desviación estándar .....	64
Espectros de los productos obtenidos y reactivos .....	65
Síntesis y caracterización del péptido VIHGW-alquino-G-NH <sub>2</sub> .....	69

<b>Tabla 1.</b> Parámetros de longitud de onda máxima, absorbancia a esta longitud de onda y el FWHM para la síntesis de AgNPs usando $\text{AgNO}_3$ a 0,6 mM .	44
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de longitud de onda máxima, absorbancia a esta longitud de onda y el FWHM para la síntesis de AgNPs usando $\text{AgNO}_3$ a 0,8 mM.	46
<b>Tabla 3.</b> Parámetros de longitud de onda máxima, absorbancia a esta longitud de onda y el FWHM para la síntesis de AgNPs usando $\text{AgNO}_3$ a 1 mM	47

Figura 1. Comparación del tamaños de NPs con objetos o moléculas .....	1
Figura 2. Mecanismos de acción de NP en células bacterianas. ....	12
Figura 3. Etapas de la nucleación y crecimiento en la síntesis de NPs.....	15
Figura 4. Diferentes tipos de conjugación NP-proteínas. ....	17
Figura 5. Esquema de la reacción click. ....	21
Figura 6. Estrategia para el acoplamiento tiol-amina de proteínas a NPs .....	21
Figura 7. Esquema de un espectrofotómetro convencional .....	25
Figura 8. Esquema de la interacción de una luz incidente con una NP. ....	27
Figura 9. Fluctuaciones de la intensidad de la luz al interaccionar con las NPs.....	28
Figura 10. Esquema de un equipo TEM. ....	33
Figura 11. Esquema de la síntesis de AgNPs.....	37
Figura 12. Esquema de la funcionalización de las AgNPs. ....	38
Figura 13. Esquema del acoplamiento del péptido con las AgNPs funcionalizadas. ....	39
Figura 14. Estructura del péptido VIHGW-alquino-G-NH <sub>2</sub> .....	40
Figura 15. Espectros UV-VIS de las AgNPs sintetizadas usando AgNO <sub>3</sub> a 0,6 mM.....	44
Figura 16. Espectros UV-VIS de las AgNPs sintetizadas usando AgNO <sub>3</sub> a 0,8 mM.....	45
Figura 17. Espectros UV-VIS de las AgNPs sintetizadas usando AgNO <sub>3</sub> a 1mM.....	46
Figura 18. TEM de las NPs.....	47
Figura 19. Espectros UV-Vis con cantidad diferente de SH-PEG-N <sub>3</sub> . ....	48
Figura 20. Espectros UV-Vis antes y después de la funcionalización.....	49
Figura 21. Variación de la longitud de onda máxima y del FWHM .....	50
Figura 22. Variación del diámetro hidrodinámico y ZP después del acoplamiento. ....	51
Figura 23. Espectros XPS . ....	52
Figura 24. Espectros IR.....	53
Figura 25. Reducción logarítmica de E. coli.....	54
Figura 26. Espectro XPS de AgNPs. ....	65
Figura 27. Espectro XPS de SH-PEG-N <sub>3</sub> . ....	65
Figura 28. Espectro XPS del péptido.....	66
Figura 29. Espectro XPS de AgNPs-S-PEG-N <sub>3</sub> . ....	66
Figura 30. Espectro XPS de AgNPs-S-PEG-VIH.....	67
Figura 31. Espectro IR de AgNPs.....	67
Figura 32. Espectro IR de SH-PEG-N <sub>3</sub> .....	68
Figura 33. Espectro IR del péptido. ....	68
Figura 34. Espectro IR de AgNPs-S-PEG-N <sub>3</sub> .....	69
Figura 35. Espectro IR de AgNPs-S-PEG-VIH.....	69
Figura 36. Espectro HPLC del péptido VIHGW-alquino-G-NH <sub>2</sub> . ....	70
Figura 37. Espectro de masas del péptido VIHGW-alquino-G-NH <sub>2</sub> . ....	71

## Resumen

La nanotecnología está continuamente aportando nuevas soluciones en diferentes áreas como son la ciencia de los materiales y la medicina. Uno de los grupos de materiales nanotecnológicos de mayor uso es el de NPs metálicas, pues encuentran aplicación como bactericidas, componentes de biosensores y vectores de transporte, entre otros. En la presente investigación se busca conjugar NPs metálicas con un péptido antibacteriano conteniendo el motivo ATCUN, el cual es una serie de 3 aminoácidos comenzando por el amino terminal en el cual el tercer aminoácido es la histidina (Libardo, Gorbatyuk, & Angeles-Boza, 2016), como una primera aproximación al desarrollo de vectores de transporte de proteínas basados en AgNPs. Estas NPs son consideradas debido a su comprobado poder bactericida. La conjugación entre las NPs y el péptido se lleva a cabo mediante una reacción click de Huisgen catalizada por Cu(I), la cual consiste en la reacción entre el grupo  $N_3$  y el grupo alquino catalizado por Cu(I) formando el anillo triazol. En este trabajo primero se funcionaliza las NPs con una molécula espaciadora (SH-PEG- $N_3$ ), y finalmente se hace reaccionar el péptido VIHGW-alquino-G-NH<sub>2</sub> con las NPs funcionalizadas en presencia de Cu(I) el cual actuará como catalizador. El producto obtenido luego de esta reacción fue caracterizado por medio de técnicas espectroscópicas como XPS, FTIR, DLS y microscópicas como TEM. Estas caracterizaciones estarán complementadas por un estudio de la actividad biocida hacia *E. Coli* usando la técnica de conteo en placas. Mediante espectroscopia FTIR se pudo demostrar que la reacción entre el péptido y las AgNPs-S-PEG- $N_3$  se dio mediante la reacción click porque la señal del grupo  $N_3$  presente en las AgNPs-S-PEG- $N_3$  desaparece una vez realizada la reacción con el péptido. Usando la técnica XPS se pudo determinar que la molécula espaciadora se unió a las AgNPs mediante el grupo funcional SH

porque en el espectro de las AgNPs-S-PEG-N<sub>3</sub> se observa que aparece un a 160 eV xii  
característico de los sulfuros metálicos. Por ultimo las pruebas antibacteriales nos dan como  
resultado que el producto final AgNPs-S-PEG-VIH presenta una mayor actividad antibacterial  
contra *E. Coli* que sus componentes individuales.



## Introducción

### 1. Nanotecnología y sus aplicaciones

#### 1.1. Definición de nanotecnología.

La nanotecnología es un área de la ciencia que se enfoca en el estudio y aplicación de la materia en dimensiones extremadamente pequeñas (0,1 a 100 nm), este tamaño es 1000 veces más pequeña que la de una bacteria como se puede ver en la figura 1, la cual puede ser aplicada en otros campos como son la química, física, biología, medicina, ingeniería y ciencia de los materiales (Feynman, 1992). En la nanoescala, estos materiales poseen propiedades características tales como efectos ópticos (Huang & El-Sayed, 2010), mayor reactividad química (Warheit, Reed, & Sayes, 2009) o diferentes propiedades mecánicas (Guo, Xie, & Luo, 2014), etc. En particular, varios nanomateriales en los últimos años han sido investigados a profundidad debido a sus grandes aplicaciones tanto en la medicina (Nikalje, 2015; Vishwakarma, Vishwakarma, & Bhatele, 2013; Zdrojewicz, Waracki, Bugaj, Pypno, & Cabala, 2015) como en las ciencias biológicas (Porter & Youtie, 2009).



**Figura 1.** Comparación del tamaño de las NPs con otros objetos o moléculas (Imágenes tomadas de internet).

La nanomedicina puede describirse como el uso de nanomateriales en el campo de la medicina. Esta nueva área es importante ya que amplía el campo de la investigación y aplicación en la medicina al insertar los conocimientos y tecnologías de otras ramas del conocimiento como las ciencias exactas y la ingeniería. La nanomedicina tiene tres grandes grupos de investigación y desarrollo, los cuales son diagnóstico médica, nanofarmacéuticos y medicina regenerativa (Boisseau & Loubaton, 2011).

- Diagnóstico médica, la cual puede ser *in vitro* o *in vivo*. Los métodos actuales para el diagnóstico médico presentan varios inconvenientes como son el costo de análisis, el tiempo de duración, la dificultad para realizar los procedimientos, la necesidad de contar con personal especializado y por último la escasa disponibilidad de éstos en ciertos puntos de atención (Antiochia, Bollella, Favero, & Mazzei, 2016). Sin embargo, gracias al avance acelerado en estos últimos años en el área de la nanotecnología ha sido posible desarrollar dispositivos de diagnóstico médico que den resultados más rápidos, que sean más sensibles al analito y más fáciles de usar.

En la diagnosis *in vitro* un nanomaterial (típicamente AuNPs y AgNPs) forma parte de un biosensor que permite una alta sensibilidad debido al efecto de plasmón superficial que tienen el oro y la plata, el cual consiste en la interacción de la luz con los electrones presentes en la superficie de las NPs. El biosensor contiene un elemento biológico, el cual puede ser una enzima capaz

de dar una señal biológica que luego sea cuantificable (Antiochia et al., 2016). 3

En la diagnosis *in vivo*, las NPs son usadas como agentes de contraste de baja toxicidad y alta sensibilidad, con lo cual se pueden obtener imágenes que permiten un rápido diagnóstico y evaluación de una amplia gama de patógenos. Muchas de las técnicas actuales para imágenes dependen de agentes de contraste administradas por vía intravenosa, pero esto origina muchos inconvenientes no deseados como una falta de especificidad tisular y problemas de toxicidad (Rosen, Yoffe, Meerasa, Verma, & Gu, 2011).

- Nanofarmacos, los cuales se enfocan principalmente en la destrucción de tumores por medio de nanoshells, nanomateriales que pueden destruir térmicamente los tumores desde el interior. Estos nanoshells están diseñados para absorber la luz a diferentes longitudes de onda, generando calor dentro del tumor y de esta forma se eliminan selectivamente las células tumorales sin alterar las células sanas vecinas (Boisseau & Loubaton, 2011).
- Medicina regenerativa, donde se usa la nanotecnología permite acelerar diversas terapias regenerativas (como las del hueso, vascular, corazón, cartílago, vejiga y tejido cerebral) por medio de diversos polímeros y metales nanoestructurados que presentan propiedades de bio- y cito- compatibilidad (Boisseau & Loubaton, 2011). Un requisito fundamental en estos casos es el funcionamiento de nanomateriales como vectores de transporte, lo que será descrito en detalle a continuación.

- Nanomateriales antibacterianos, lo cual es sumamente importante actualmente debido a que las bacterias tienen la capacidad de desarrollar resistencia hacia antibióticos, lo que hace que las infecciones bacterianas continúen siendo la mayor causa de mortalidad a pesar de que se han desarrollado numerosos antibióticos u otros agentes antimicrobianos (Beyth, Hourí-Haddad, Domb, Khan, & Hazan, 2015). Es por esta razón que se ha estado prestando especial atención al área de nanomateriales ya que son muy prometedores y podrían complementar o incluso actuar de forma más eficaz que los antibióticos actuales. Esto debido a que los nanomateriales tienen la capacidad de combatir las bacterias multirresistentes y los biofilms (Beyth et al., 2015; Pelgrift & Friedman, 2013). Entre los nanomateriales más usados para actuar como agentes antimicrobianos están las NPs metálicas y las NPs orgánicas. Dentro de las NPs orgánicas están las NPs poliméricas las cuales no presentan en sí actividad antimicrobiana pero tienen la capacidad de encapsular antibióticos, péptidos antimicrobianos u otros agentes antimicrobianos y liberarlos poco a poco cuando se va degradando el polímero (Michalak et al., 2016). Otro tipo de NPs orgánicas pueden ser los compuestos de amonio cuaternarios, alquilpiridínios o fosfonio cuaternario los cuales actúan como agentes antimicrobianos mediante contacto directo con su superficie catiónica (Beyth et al., 2015). Estas NPs son menos estables que las NPs metálicas en condiciones ambientales (especialmente a alta temperatura) y esta es una de las razones por la cual las NPs metálicas son empleadas con mayor frecuencia como agentes

antibacteriales (Beyth et al., 2015). Estas NPs han sido las más estudiadas ya 5  
que por sus dimensiones en la escala nanométrica estas partículas son más  
reactivas porque presentan una mayor área superficial lo cual les permite tener  
un mayor contacto con las bacterias y al presentar diferentes formas de acción  
contra las bacterias es difícil que éstas desarrollen una resistencia hacia las NPs  
metálicas (Beyth et al., 2015; Pelgrift & Friedman, 2013). Las NPs conteniendo  
metales que han sido más estudiadas debido a sus propiedades antibacteriales  
son de plata, dióxido de titanio, óxido de zinc y óxido de cobre. De este tema se  
va hablar con mayor profundidad en el siguiente capítulo.

## **2. Agentes antibacteriales: Desafíos y oportunidades**

### **2.1. Costos e impacto social de las bacterias multirresistentes.**

Hoy en día a pesar de la existencia de potentes antibióticos una de las mayores  
causas de mortalidad y morbilidad son las infecciones que en la mayoría de los casos  
se da en los mismos hospitales. Esto es debido a que a pesar que se han desarrollado y  
se siguen desarrollando antibióticos más potentes, los microorganismos tienen la  
capacidad de desarrollar resistencia a múltiples antibióticos (Nikaido, 2010). Además,  
la mayoría de los grupos de antibióticos que se usan actualmente tienen como blanco  
interrumpir tres funciones específicas de las bacterias: la síntesis de la pared celular,  
la maquinaria de traducción y la maquinaria de replicación del ADN. Sin embargo,  
las bacterias tienen la capacidad de desarrollar resistencia contra estos tres modos de  
acción (Wang & Hu, 2017). Esta resistencia que adquieren las bacterias se puede dar  
por dos mecanismos distintos. En el primer caso, las bacterias pueden acumular  
múltiples genes en el cual cada uno de estos codifica la resistencia a un solo fármaco.

El segundo mecanismo se da cuando hay un aumento de la expresión de los genes 6  
que codifican las bombas de eflujo de salida de múltiples fármacos (Nikaido, 2010).  
De hecho, hoy en día, hay bacterias que han desarrollado resistencia a casi todos los  
antibióticos debido al uso excesivo de éstos, este tipo de bacterias presenta un gen  
super resistente llamado NDM-1 (Hsueh, 2010; Wang & Hu, 2017).

Las bacterias tienen la capacidad de formar biofilms, los cuales presentan no sólo una  
especie de bacteria sino un conjunto de especies que interactúan entre ellos. Estos  
dependen de una superficie sólida y productos extracelulares (Wang & Hu, 2017). Una  
vez que los biofilms se asientan son muy peligrosos para la salud y no solo porque son  
capaces de resistir el tratamiento con múltiples antibióticos sino también porque pueden  
producir superantígenos que les permite evadir el sistema inmunológico (Hajipour et al.,  
2012; Jung & Jik, 2011; Wang & Hu, 2017). Es por eso que debido a que los  
microorganismos tienen la capacidad de desarrollar resistencia a múltiples antibióticos y  
también al sistema defensivo de las personas se estima que en Europa se ha invertido al  
menos unos 1.5 billones de dólares y en Estados Unidos unos 55 billones de dólares para  
el tratamiento de estas infecciones, incluyendo los costos de pacientes y hospitales  
(Laxminarayan, 2014). Es por eso que este tipo de microorganismos es una gran  
preocupación a nivel mundial ya que impactan tanto en la salud de la población global  
como en el costo de los sistemas de salud (Naylor et al., 2018). Es debido a eso que hoy  
en día se están desarrollando nuevos agentes antibacteriales tales como las NPs (Beyth et  
al., 2015) y los péptidos antibacteriales (Mahlapuu, Håkansson, Ringstad, & Björn, 2016)

## 2.2. Agentes antibacteriales.

### - Péptidos antibacteriales. -

Los péptidos antibacteriales también son conocidos como péptidos de defensa del huésped, éstos son generalmente cadenas cortas de péptido que están cargados positivamente. Los péptidos antibacteriales pueden actuar de dos formas frente al patógeno, la primera es cuando mata directamente al patógeno y en el otro caso es un mecanismo indirecto en el que el péptido modula los sistemas de defensa del huésped (Mahlapuu et al., 2016). Los péptidos antibacteriales están siendo ampliamente estudiados debido a que presentan un amplio espectro antimicrobiano, el cual es crucial para el sistema defensivo del huésped. Además, este tipo de péptidos son muy interesantes porque presentan un mecanismo de acción complejo para actuar como agente antibacteriano, este mecanismo puede ser explicado por el modelo SMH. Este modelo explica la actividad de la mayoría de los péptidos antibacterianos por medio de una interacción directa entre los péptidos antibacterianos y la bacteria causando una alteración de la estructura de la membrana y, en ciertos casos, la entrada del péptido al interior de la célula (Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006; Pal et al., 2016; Ruden, Hilpert, Berditsch, Wadhwani, & Ulrich, 2009; Shai, 1999; Zasloff, 2002). Cuando las moléculas de colesterol están presentes en la membrana, en general, se reduce la actividad del péptido antibacteriano y esto debido a dos motivos; la estabilización de la capa lipídica o la interacción entre el colesterol y el péptido (Matsuzaki, 1999; Zasloff, 2002). Otro factor que disminuye la actividad de los péptidos antibacterianos es el aumento de la fuerza

iónica, esto debido a que este aumento debilita las interacciones de carga electrostática necesarias para la interacción inicial (Zasloff, 2002). Gracias a este complejo mecanismo, la posibilidad de que los patógenos desarrollen una resistencia hacia estos agentes antibacterianos es más complicada. Muchos de los péptidos antibacterianos presentan el motivo ATCUN, el cual tiene la capacidad de unirse favorablemente a iones cobre y níquel (Libardo et al., 2016). Se ha demostrado que cuando el motivo ATCUN se ha unido a un péptido antimicrobiano, el cual no presenta motivo ACTUN, éste aumenta su actividad antibacteriana comparado con el péptido original (Libardo, Cervantes, Salazar, & Angeles-Boza, 2017; Libardo et al., 2016). Este aumento en la actividad antibacteriana es debido a la capacidad que presenta el motivo ATCUN para producir ROS, los cuales tienen la capacidad de dañar la membrana lipídica o el ADN (Libardo et al., 2017).

A pesar de presentar una serie de características que hacen que los péptidos antibacteriales sean muy prometedores para combatir distintas infecciones y en especial bacterias resistentes a múltiples antibióticos, los péptidos antibacterianos tienen algunas características que limitan su aplicación clínica tales como su inestabilidad *in vivo* y su baja penetrabilidad (Lee et al., 2017). Los péptidos antibacteriales al ser catiónicos o anfifílicos pueden unirse fácilmente a las proteínas séricas y posteriormente degradarse debido a la enzima proteolítica (Lee et al., 2017; Nordström & Malmsten, 2017; Singh, Papareddy, Mörgelin, Schmidtchen, & Malmsten, 2014). Con el fin de superar



estas limitaciones, se ha intentado modificar químicamente los péptidos antibacterianos, tal como bloquear el amino o carboxilo terminal de los péptidos (Brinckerhoff et al., 1999; Lee et al., 2017) para evitar la proteólisis del péptido. La carga de estos péptidos en carriers tales como lípidos o polímeros también han sido estudiados para incrementar la eficiencia de los péptidos, aunque el proceso de carga es difícil de realizar (Mishra, Reiling, Zarena, & Wang, 2017; Nordström & Malmsten, 2017). Es por eso que algunos estudios se han enfocado en el uso de AgNPs o AuNPs para el transporte de los péptidos antibacteriales. En ambos casos, se ha observado que cuando los péptidos antibacterianos se unen a las NPs, los péptidos incrementan su estabilidad *in vivo* (Lee et al., 2017; Pal et al., 2016) y cuando se usa AgNPs se ha observado que hay un efecto sinérgico entre el péptido antibacteriano y las AgNPs (Ruden et al., 2009). Hay dos enfoques para la unión de los péptidos antimicrobianos a las NPs. El primer enfoque es mediante una interacción directa, este tipo de interacción puede ayudar a aumentar la estabilidad *in vivo* del péptido antibacteriano (Pal et al., 2016). Otra ventaja de esta interacción directa es que la actividad antibacteriana de los péptidos antibacterianos aumenta mientras la toxicidad de las NPs y los péptidos decrece (Pal, Mitra, Azmi, Ghosh, & Chakraborty, 2011; Rai et al., 2016; Rajchakit & Sarojini, 2017). La forma más común para la unión directa de los péptidos antibacteriales con AuNPs es la formación del enlace covalente Au-S. La desventaja de esta interacción es que cabe la posibilidad de que haya una pérdida de la actividad antibacterial del péptido debido a que su estructura se puede modificar. El segundo enfoque para poder cargar los péptidos

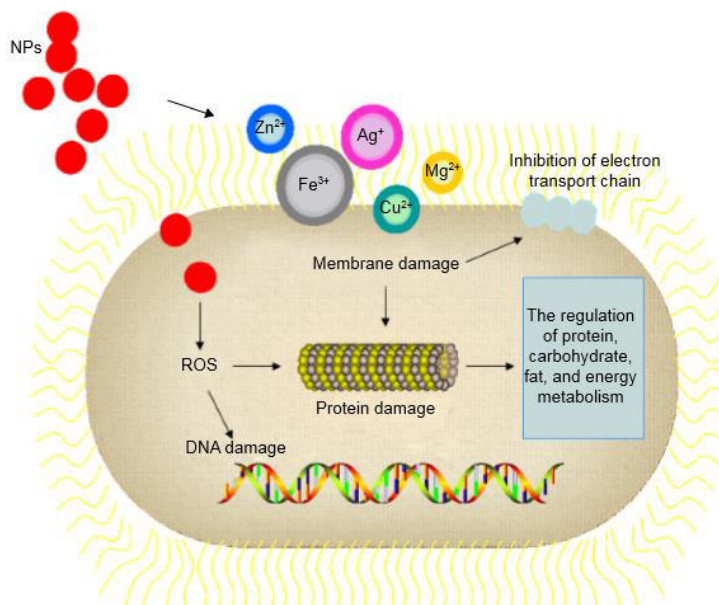
antibacterianos en las NPs es usando una unión bifuncional. Esta unión en la 10 mayoría de los casos presenta un grupo tiol por una de sus terminaciones, especialmente cuando se trabaja con AuNPs para formar un buen enlace entre la unión y las NPs mediante un enlace covalente Au-S (Lee et al., 2017). El otro lado de la unión tiene que ser un grupo funcional apropiado tal como ácido carboxílico, azida, etc. (Rajchakit & Sarojini, 2017). Este enfoque no ha sido muy desarrollado. Sin embargo, el grupo de *Maria Luisa Mangoni et al.* ha unido el péptido antibacteriano (esculentin-la (1-21)-NH<sub>2</sub>) a AuNPs usando como molécula de unión el polietilenglicol y se ha demostrado que el complejo péptido-NPs posee una actividad antibacteriana doce veces mayor que solo el péptido (Casciaro et al., 2017; Rajchakit & Sarojini, 2017). En este caso ellos usaron la reacción carbodiimida para formar un enlace amida entre el ácido carboxílico presente en la molécula de unión y el amino terminal del péptido antibacteriano.

Lo que diferencia las investigaciones previas sobre NPs acopladas a péptidos antibacteriales con la presente investigación es primero que el péptido que se está usando en este trabajo es diferente y presenta el motivo ATCUN y también porque anteriormente no se ha usado la reacción click para unir NPs con péptidos antibacteriales.

#### - **Nanopartículas metálicas.** -

En estos últimos años uno de los agentes antibacteriales que está siendo ampliamente estudiado son las NPs metálicas, especialmente las de plata. Como

se sabe las bacterias multirresistentes desarrollan diferentes mecanismos para 11  
adquirir esa resistencia contra los antibióticos tales como expresar enzimas que  
son capaces de degradar o modificar los antibióticos, como los aminoglucósidos  
(Poole, 2002), expresar las bombas de eflujo, que proporcionan resistencia  
simultánea contra varios antibióticos a la vez (Nikaido, 2010; Knetsch & Koole,  
2011; Wang & Hu, 2017). Sin embargo, estos mecanismos de acción que  
desarrollan las bacterias no afectan a las NPs debido a que éstas tienen un modo  
de acción distinta a las de los antibióticos. El modo de acción de las NPs es  
mediante un contacto directo con la pared celular de las bacterias, sin necesidad  
de penetrar en la célula y es por esta razón que es complicado que las bacterias  
puedan adquirir resistencia hacia las NPs, por lo cual este nuevo material es de  
gran interés. Una vez que las NPs están en contacto con la pared celular  
bacteriana existen 4 vías por las que las NPs interrumpen el crecimiento  
bacteriano, esto se puede ver en la figura 2. 1era vía; generación de ROS. 2da  
vía; ruptura de la membrana de la célula bacteriana. 3era vía; evita la replicación  
del ADN bacteriano. 4ta vía; penetración de la membrana celular bacteriana  
(Wang & Hu, 2017).



**Figure 2.** Mecanismos de acción de la NP en células bacterianas (Wang & Hu, 2017).

Aparte de la acción por daño a la pared celular, existen otros tres posibles mecanismos de acción. 1er mecanismo; mediante la liberación de iones metálicos (Nagy, Harrison, & Dutta, 2011), 2do mecanismo; mecanismos no oxidativos (Kumaran, Choi, Singh, & Song, 2015) e inducción de estrés oxidativa (Han & Kim, 2012) y 3er mecanismo; también pueden ocurrir simultáneamente los tres mecanismos. Otros estudios proponen que las NPs generan ROS los cuales inhiben el sistema de defensa antioxidante y causan daño a la membrana celular (Agnihotri, Mukherji, & Mukherji, 2014). Además, ciertos estudios proponen otra clase de mecanismo en el cual las AgNPs cambian la penetrabilidad de las bacterias mediante un proceso de neutralización de la carga eléctrica de la superficie de la membrana bacteriana, lo que finalmente provoca la muerte de la bacteria (Jung et al., 2008; Wang & Hu, 2017).

### 3. Nanopartículas metálicas.

#### 3.1. Síntesis

Existe una gran variedad de NPs dependiendo del material de partida y por lo tanto también existen una gran variedad de formas de sintetizar estas NPs.

Los métodos de síntesis de NPs se pueden dividir en dos estrategias muy grandes uno de es el método top-down, en el que se parte de un material macroscópico y mediante técnicas físicas se tiene un producto nanométrico. Por el contrario, en el método bottom-up se parte de compuestos atómicos (moléculas, iones) los cuales forman partículas. Estos dos grandes métodos se pueden dividir en tres métodos dependiendo de cuál es el agente reductor:

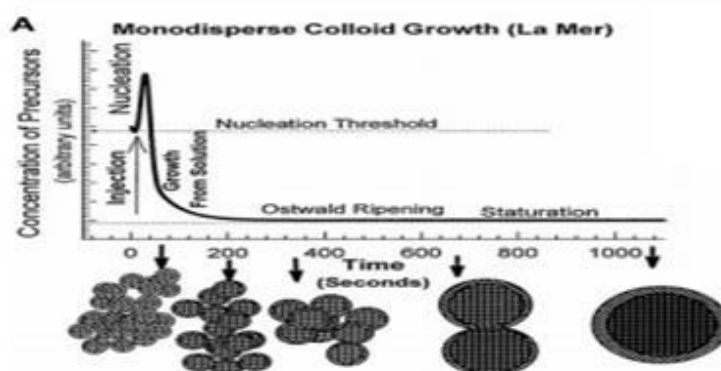
**Métodos físicos.** - En este método se aplica generalmente la estrategia top-down, en el cual al material de partida se le aplica energía magnética, electromagnética, eléctrica o térmica para generar las NPs por abrasión, ablación o evaporación/condensación. La mezcla seguida de un calentamiento en atmósfera inerte es uno de los pocos casos de bottom-up que se encuentran en los métodos físicos. Este caso en particular implica la mezcla en seco de una sal metálica precursora (por ejemplo, un acetato metálico) con nanotubos de carbono (monocapa o multicapa) seguido por calentamiento en una atmósfera inerte (Lin et al., 2009).

En general, estos métodos tienen la ventaja de no emplear solventes por lo que 14  
son menos contaminantes, pero una gran desventaja de estos métodos es el alto  
costo debido a que se usan energías muy altas y la falta de control sobre la  
distribución de tamaño.

**Métodos biológicos.** - Este método se basa en el metabolismo de los  
microorganismos (bacterias, hongos, etc.). Los microorganismos tienen la  
capacidad de acumular y desechar metales pesados debido a diversas enzimas  
reductasas, que son capaces de reducir las sales metálicas a NPs metálicas con una  
distribución estrecha de tamaño y, por lo tanto, menos polidispersidad. Entre las  
diversas metodologías, la síntesis extracelular ha recibido mucha atención porque  
elimina las etapas de extracción de las NPs, en las cuales se necesita sonificar,  
ultracentrifugar varias veces, entre otras cosas para romper la pared celular. (Singh,  
Kim, Zhang, & Yang, 2016) Estos métodos presentan baja toxicidad, son  
rentables y eficientes. Uno de los problemas es la manipulación de  
microorganismos a gran escala que siempre presenta riesgos de contaminación  
biológica.

**Métodos químicos.** - Existen muchas técnicas para la síntesis de NPs mediante  
métodos químicos, pero todas tienen un mismo fundamento. La primera etapa de  
toda técnica de síntesis de NPs es la formación de los núcleos, lo cual se logra por  
la reducción de los precursores metálicos usando un agente reductor. Los núcleos  
metálicos recién formados siguen el proceso de crecimiento lento que conducen a

la formación de NPs. En la figura 3, se puede observar cómo se va dando la nucleación y crecimiento de las NPs respecto al tiempo y concentración del precursor. Esta noción fue descrita por primera vez en detalle por LaMer y Dinegar (LaMer & Dinegar, 1950; Murray, Kagan, & Bawendi, 2000).

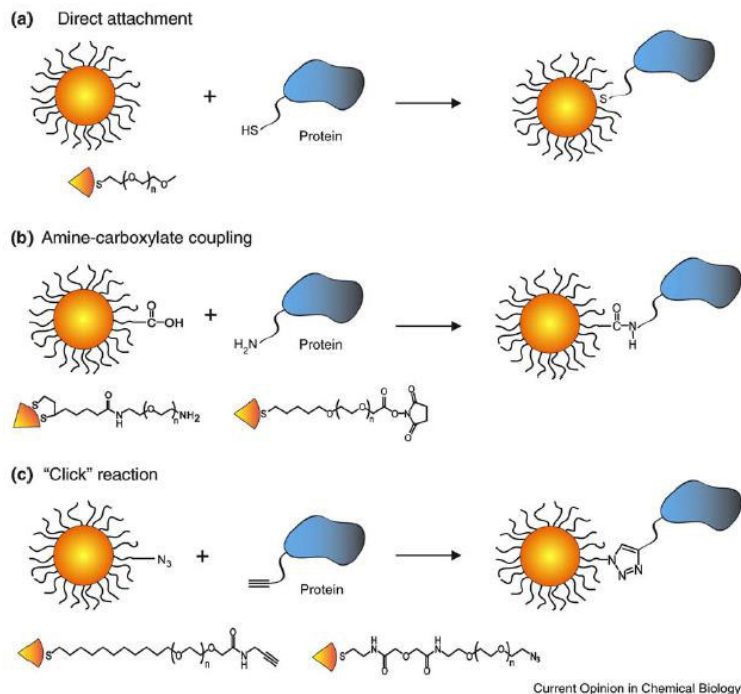


**Figura 3.** Etapas de la nucleación y crecimiento en la síntesis de NP (Murray et al., 2000).

El primer método para la síntesis de las AuNPs fue el método de Turkevich (Kimling et al., 2006) que empleaba ácido cloráurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) y citrato de sodio como precursor metálico y agente reductor, respectivamente. En el caso de las AgNPs el primer método que se desarrolló fue el de Creighton (Abou El-Nour, Eftaiha, Al-Warthan, & Ammar, 2010) empleando nitrato de plata como precursor metálico y borohidruro de sodio como agente reductor. Para que las NPs sintetizadas sean monodispersas se deben controlar varios parámetros fisicoquímicos como son el pH, temperatura, solvente, concentración del reductor, el precursor metálico, el agente dispersante, etc.

Las biomoléculas se pueden acoplar a las NPs siguiendo metodologías directas o indirectas, en la figura 4, se pueden ver las diferentes formas de interacción entre las NPs y biomoléculas. La metodología directa se da cuando se añaden biomoléculas a una suspensión de AuNPs, éstas pueden adsorberse en la superficie de las partículas por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, Van der Waals o de coordinación (Salazar-González, González-Ortega, & Rosales-Mendoza, 2015; Rana, Yeh, & Rotello, 2010). Las interacciones electrostáticas ocurren entre los restos cargados positivamente de la biomolécula con la superficie de las NPs que están cargadas negativamente. Las interacciones hidrofóbicas ocurren cuando las biomoléculas se adsorben en la superficie de las NPs mediante sus restos hidrofóbicos, en cambio, las interacciones Van der Waals ocurren cuando las biomoléculas se adsorben en las NPs, pero mediante interacciones que implican dipolos y por último la interacción de coordinación ocurren cuando se establece un enlace de coordinación entre las NPs y las biomoléculas (Salazar-González et al., 2015).





**Figura 4.** Conjugación NPs-proteína mediante la formación de un enlace covalente. (a) Unión directa del grupo tiol de la proteína en la superficie de las NPs. (b) Acoplamiento amina-carboxilato. (c) acoplamiento NPs-proteína usando la reacción click (Rana et al., 2010)

### 3.3. Interacción indirecta

En el caso de la metodología indirecta se utiliza un enlazador el cual se va unir mediante interacción de coordinación con las NPs y mediante una reacción va a formar un enlace covalente con la biomolécula (Salazar-González et al., 2015), esto va a permitir que la unión entre la biomolécula y las NPs sea más estable frente a la disociación, lo cual es importante para muchas aplicaciones (Rana et al., 2010).

Cuando se desea cargar NPs con biomoléculas y no se desea que éstas pierdan su actividad biológica es preferible usar los métodos indirectos ya que a pesar que los métodos directos son más sencillos de realizar tienen la enorme desventaja que es más probable que la estructura de la biomolécula se modifique y de esta forma pierda

su actividad. (Rana et al., 2010) empleó métodos directos para obtener NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con mayor estabilidad en el suero, (Samanta et al., 2008; Rana et al., 2010) pero en este caso no importaba que la biomolécula conserve su estructura. La razón por la que la estructura de la biomolécula se modifica es por las diversas interacciones que pueden existir; por ejemplo, entre los grupos funcionales de una proteína y la superficie de las NPs. Por lo tanto, el método que perturbe menos a la estructura de la proteína sería aquel en el que la proteína tenga un solo grupo cisteína disponible para unirse a las AuNPs (Aubin-Tam, Hwang, & Hamad-Schifferli, 2009). Pero en este caso, también hay posibilidad de que la biomolécula se desnaturalice, en particular debido a que es muy probable que una proteína no tenga un solo grupo cisteína presente en su estructura.

#### - **Funcionalización de nanopartículas metálicas**

La funcionalización de NPs consiste en la modificación de su superficie haciendo uso de diversos tipos de moléculas. Las estrategias de funcionalización de superficie apropiadas son un requisito previo para cada aplicación posible, puesto que estas interacciones afectan tanto a la estabilidad de las NPs como a las propiedades fisicoquímicas de éstas (Ravindran, Chandran, & Khan, 2013). Los nanomateriales funcionalizados diseñados para realizar una reacción específica son de gran interés debido a sus usos potenciales en diagnósticos médicos, entrega de fármacos y catálisis (Fleming, Thode, & Williams, 2006). Según Ruckenstein y Li, aunque muchas NPs poseen excelentes propiedades fisicoquímicas, no poseen propiedades superficiales adecuadas para aplicaciones

específicas. (Ravindran et al., 2013; Ruckenstein & Li, 2005). Por lo tanto, la 19 funcionalización controlada de la superficie de las NPs con alguna molécula adecuada cambia la estructura, la composición superficial y la morfología de un material, dejando intactas las propiedades principales de las NPs. También se sabe que la modificación superficial de los nanomateriales es esencial pues esta capa facilita la reducción de la energía superficial proporcionando un recubrimiento protector que evita que las NPs se aglomeren, es decir, se vuelven más estables (Ravindran et al., 2013).

Una de las NPs de la que más se ha estudiado su forma de funcionalizar son las AuNPs, debido a que la funcionalización de estas NPs presenta un amplio rango de aplicaciones en biología, nanomedicina, óptica (Mulvaney, 1996) y catálisis (Haruta & Daté, 2001). La funcionalización de las AuNPs se pueden llevar a cabo mediante distintas técnicas como son la síntesis directa (Brust, Walker, Bethell, Schiffrin, & Whyman, 1994), reacción de intercambio de ligandos (Templeton, Wuelfing, & Murray, 2000) y procesos de alta temperatura (Boisselier, Salmon, Ruiz & Astruc, 2008).

- **Acoplamiento de biomoléculas activas con nanopartículas metálicas.**

**Acoplamiento carbodiimina.**

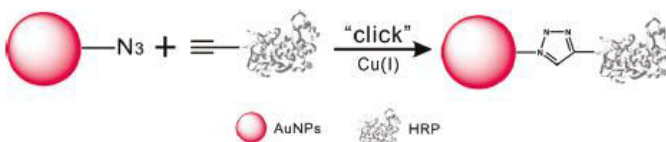
Numerosos esfuerzos se han desarrollado para evitar la desnaturalización de una proteína durante su acoplamiento a otros sistemas. En el caso de estos métodos se emplean moléculas espaciadoras; su elección es crucial para que la biomolécula no sufra una desnaturalización, uno de los más empleados son los OEG ya que reducen las interacciones no específicas, así como

proporcionan grados adicionales de libertad para los grupos funcionales 20 terminales (Rana et al., 2010). Una vez que la molécula espaciadora se funcionaliza con las NPs, esta molécula puede unirse a la proteína por varios métodos. Uno de éstos es el método estándar de acoplamiento de amina-carboxilato (Drechsler, Fischer, Frankamp, & Rotello, 2004; Rana et al., 2010), otro método que se ha empleado es el acoplamiento con carbodiimida (Thorek, Elias, & Tsourkas, 2009; Biju, 2014). Este es uno de los métodos que más se ha usado para el acoplamiento de NPs con macromoléculas (Hermanson, 2008) en el cual se usa el EDC el cual va a reaccionar con las NPs que deben tener en su superficie grupos carboxilos, los cuales en presencia de sulfo-NHS van a formar una amina reactiva la cual va a ser la que reaccione directamente con la macromolécula (Thorek et al., 2009). Desafortunadamente esta reacción no es muy eficaz y se necesita usar altas cantidades de macromolécula. Solamente alrededor de 1 al 20% de la macromolécula se une a las NPs (Kocbek, Cegnar, Kos, & Kristl, 2007; Thorek et al., 2009; Tsourkas et al., 2005).

### **Reacción Click de Huisgen.**

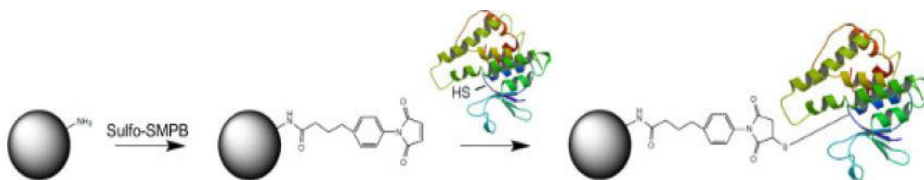
Un método más reciente que se ha utilizado es la reacción click de Huisgen llamada también cicloadición de 1,2,3-triazol catalizada con cobre (I) para unir proteínas a NPs funcionalizadas en presencia de un catalizador de cobre (Rana et al., 2010). En este caso la molécula espaciadora, la cual se va a funcionalizar con las NPs, más empleada en la reacción click de Huisgen

es SH-PEG-N<sub>3</sub> (Brennan et al., 2006) y el dodecanotiol (Boisselier et al., 21 2008). Este método se ha empleado para unir a las NPs biomoléculas como la lipasa (Brennan et al., 2006), luciferasa (Kim et al., 2010), peroxidasa (Zhang, Huang, Sun, & Pang, 2010) y anticuerpos (Thorek et al., 2009) sin que éstas pierdan su actividad biológica. En la figura 5, se muestra un esquema en el cual las NPs de oro han sido unidas a la peroxidasa mediante la reacción click.



**Figura 5.** Esquema de la reacción click catalizada con cobre (Zhang et al., 2010).

A parte de la reacción click de Huisgen catalizada con Cu (I), existen otro tipo de reacciones click como la de acoplamiento direccional de tiol-amina sin el uso de catalizador como se puede ver en la figura 6 (Stones, Al-Saedi, Vaz, Perez-Soto, & Krachler, 2015).



**Figura 6.** Estrategia utilizada para el acoplamiento direccional de tiol-amina de proteínas a NPs (Stones et al., 2015).

La ventaja de este acoplamiento respecto a la catalizada por Cu (I), es que este catalizador puede inhibir la actividad de la proteína y además si esta reacción se necesita realizar *in vivo* se tiene que tener en cuenta que el Cu es tóxico para el organismo en ciertas dosis (Baskin et al., 2007). Sin embargo, una desventaja puede ser que para llevar a cabo la reacción de acoplamiento tiol-amina es necesario que la proteína tenga un grupo cisteína y que éste no forme parte del sitio activo; en cambio, la reacción catalizada con Cu (I) se puede llevar a cabo modificando el grupo lisina o el aminoácido C o N – terminal lo que le da más posibilidades de unión. El rápido desarrollo de las reacciones click es evidente por su uso en una variedad de disciplinas, incluyendo la química medicinal, los materiales y la ciencia de polímeros. Esto se debe a sus grandes ventajas, como el hecho que presenta un alto rendimiento en el acoplamiento de las NPs con las biomoléculas, en cambio en el acoplamiento con carbodiimida el rendimiento es bajo (Thorek et al., 2009).

#### **4. Técnicas de caracterización de nanopartículas.**

##### **4.1. Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).**

Esta técnica espectroscópica es ampliamente usada para la identificación de grupos funcionales tanto en compuestos orgánicos como inorgánicos. Los espectros infrarrojos son la huella dactilar de un compuesto en donde las bandas de absorbancia corresponden a la frecuencia de vibración de los átomos que forman el compuesto (Zhang and Cresswell, 2016). Se dice que los espectros infrarrojos son la huella dactilar porque ningún compuesto tiene la misma composición elemental y el mismo

arreglo de sus elementos. Otra ventaja de esta técnica es que el tamaño de los picos <sup>23</sup> está relacionado con la cantidad de grupos funcionales presentes en el compuesto. El FTIR se basa en que la mayoría de las moléculas absorben la luz en la región infrarroja del espectro electromagnético, esta interacción entre las moléculas y la luz en esta región no produce la excitación de los electrones sino que causa que los átomos y moléculas vibren alrededor de su enlace lo que se conoce como modos de vibración (Zhang and Cresswell, 2016).

En el equipo IR, la radiación infrarroja pasa a través de la muestra aumentando la longitud de onda de la radiación sucesivamente. Esto va a producir la vibración de las moléculas, dicha absorción puede ocurrir sólo si el momento dipolar de la molécula es diferente en los dos niveles vibracionales. Por lo tanto, las bandas de absorción en el espectro IR solo se va a originar cuando hay un cambio del momento dipolar de la molécula ya que al variar el momento dipolar debido al cambio en las distancias interatómicas durante la vibración producirá un campo eléctrico oscilante que puede interactuar con el campo eléctrico asociado con la radiación electromagnética, en caso contrario se les llama moléculas inactivas infrarrojas.

El método convencional para medir el espectro IR tenía la desventaja de que era muy lento. En la obtención del espectro IR con el método convencional cada punto del espectro se debía registrar por separado. Esto debido a que la frecuencia emitida por la muestra era detectada por el detector en función del tiempo por lo tanto este método creaba muchos problemas cuando el sistema tenía que manejar una serie de frecuencias en un tiempo dado. Para poder superar estos problemas se desarrolló la

técnica de Transformada de Fourier. En este método los datos se detectan en el dominio de la frecuencia en lugar del tiempo (Smith, 2011).

Este método es usado frecuentemente para hacer el seguimiento de la reacción click Huisgen entre las NPs funcionalizadas y diferentes moléculas (Socaci, Magerusan, Nan, & Turcu, 2013) o también entre dos tipos diferentes de NPs funcionalizadas (Liu, Williams, Miller, & Teplyakov, 2016; Williams & Teplyakov, 2016; Liu, Ramarao, Miller, Hadjipanayis, & Teplyakov, 2013).

- Espectroscopía infrarroja por reflexión total atenuada (ATR-IR).

Se sabe que para medir muestras líquidas y sólidas en el FTIR convencional se tiene que preparar las muestras de diversas formas como, por ejemplo, en el caso de muestras sólidas, se tiene que preparar las pastillas de KBr, lo cual no es fácil de realizar ya que la muestra y el KBr tienen que estar homogéneos, entre otras dificultades. Es por eso que es preferible trabajar con la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) ya que no necesita preparación especial para medir las muestras sólidas o líquidas.

La parte clave de este accesorio es el cristal el cual puede variar según el tipo de muestra que se quiera medir, pero este siempre tiene un índice de refracción muy alto que debe ser mayor que el de la muestra (Smith, 2011). El funcionamiento de este accesorio se basa en que el haz de luz del equipo IR se dirige al cristal del ATR con un cierto ángulo, el cual refleja el haz lo que produce una onda evanescente que se extiende hasta la muestra. Finalmente, la energía atenuante de cada onda evanescente se junta con el haz de IR

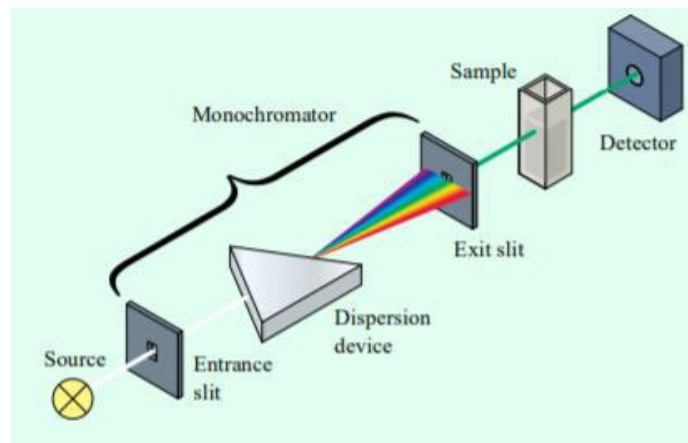


nuevamente lo que posteriormente es detectado por el equipo y origina el espectro IR (Smith, 2011)

25

#### 4.2. Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis).

El principio general de la mayoría de los espectrofotómetros es que una luz policromática de la fuente pasa a través de un monocromador, que transmite selectivamente una estrecha banda de luz. Esta luz pasa por la muestra y finalmente llega al detector, este proceso se puede ver en la figura 7. Por lo tanto, la absorbancia de una muestra se determina midiendo la intensidad de luz que llega al detector sin la muestra, el cual sería el blanco, en comparación con la intensidad de luz que llega al detector pero que si pasa a través de la muestra (Owen, 1996).



**Figura 7.** Esquema de un espectrofotómetro convencional (Owen, 1996).

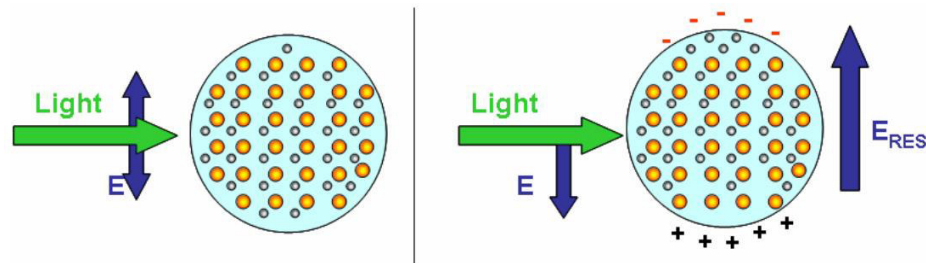
La mayoría de los espectrofotómetros presentan dos fuentes de luz, una es la lámpara de deuterio y la otra de tungsteno. La lámpara de deuterio produce una intensidad continua en la región UV y también proporciona una intensidad útil en el rango visible. Sin embargo, el factor limitante de esta lámpara es el rendimiento

general del ruido del instrumento. Este tipo de lámparas tiene generalmente una vida media (el tiempo que debe transcurrir para que la intensidad de la lámpara decaiga hasta la mitad de su intensidad inicial) de aproximadamente 1.000h. El otro tipo de lámpara es la de tungsteno, la cual tiene una buena intensidad tanto en la región UV como en la región visible y a diferencia de la lámpara de deuterio, ésta presenta muy poco ruido y además tiene una vida útil de 10.000h (Owen, 1996). Como se mencionó anteriormente estos dos tipos de lámparas están presentes en la mayoría de los espectrofotómetros en los cuales se emplea un selector de fuente para cambiar entre las lámparas según lo que se desea medir.

Esta técnica es muy importante para la caracterización de NPs ya que éstas tienen propiedades ópticas que dependen del tamaño, forma, concentración, estado de aglomeración e índice de refracción cerca de la superficie de las NPs. Las NPs interactúan fuertemente con la luz de cierta longitud de onda y al hacerlo producen un plasmón superficial de resonancia (SPR), como se ve en la figura 8. Es importante comprender el significado físico del SPR, el cual se puede entender mediante la siguiente representación. Una NP metálica se puede representar como una red de núcleos, en el cual los electrones de conducción se mueven casi libremente dentro de la NP. Cuando incide un haz de luz sobre la NP el campo electromagnético de la luz incidente ejerce una fuerza sobre los electrones de conducción. Sin embargo, al estar confinados dentro de la NP se va a formar un dipolo ya que se acumulará la carga negativa por un lado y la positiva por otro. Pero este dipolo genera un campo eléctrico dentro de la NP que es opuesta al campo de la luz incidente lo que obliga a los

electrones a regresar a su posición de equilibrio (Garcia, 2011). Esto es muy similar a un oscilador lineal. Todo este proceso es el que genera el SPR.

27



**Figura 8.** Esquema de la interacción de una luz incidente con una NP (Garcia, 2011).

Esta técnica es usada rutinariamente en la síntesis de NPs, la cual nos da información importante de las NPs como son el tamaño, concentración, forma (Agnihotri et al., 2014; Mock, Smith, & Schultz, 2003) y además, si las NPs son funcionalizadas con diferentes moléculas su SPR varía (Rahme et al., 2013).

#### **4.3. Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial zeta (ZP).**

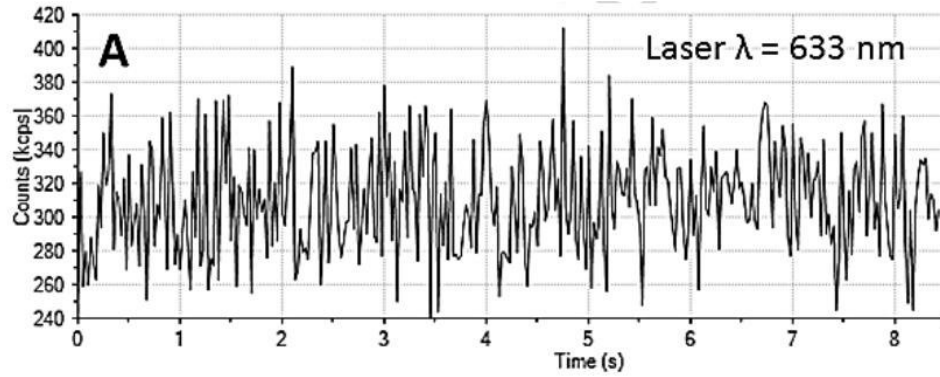
La dispersión de la luz dinámica (DLS) que es también conocida como espectroscopía de correlación de fotones y el ZP se han desarrollado como técnicas para la medición del tamaño hidrodinámico y la carga superficial de las NPs, respectivamente.

El equipo de DLS mide el tamaño hidrodinámico de las NPs, ya que éstas en suspensión dispersan la luz monocromática incidente que emite el equipo, fenómeno conocido como ensanchamiento Doppler (Stetefeld, McKenna, & Patel, 2016), y la intensidad de luz que es dispersada. Las NPs que se están midiendo causan interferencias constructivas y destructivas y eso origina que la intensidad de la luz dispersada fluctúe con el tiempo y se forme un patrón como en la figura 9, esto es

debido también a los continuos cambios en la distancia entre las NPs

28

(Bhattacharjee, 2016).



**Figura 9.** Fluctuaciones de la intensidad de la luz al interactuar con las NPs (Bhattacharjee, 2016).

Estas fluctuaciones de intensidad que se miden en el DLS contienen información sobre la escala de tiempo del movimiento de las NPs (Lorber, Bailly, Kern, & Fischer, 2012), las cuales son medidas con un aparato que correlaciona la fluctuación de intensidad de la luz dispersada con respecto al tiempo y de esta forma se determina la rapidez con la que ocurre la fluctuación de intensidad (Stetefeld et al., 2016). Por su parte la función de autocorrelación se obtiene a través de la ecuación (1), pero solo es para muestras puramente monodispersas (Bhattacharjee, 2016).

$$G(\tau) = 1 + b \cdot e^{-2D_t q^2 \tau} \quad (1)$$

Donde  $b$  es una constante que depende del instrumento y la configuración de la óptica,  $D_t$  es el coeficiente de difusión de traslación,  $\tau$  es decaimiento.

Mediante el ajuste de datos en el equipo DLS se calcula la función de autocorrelación y el coeficiente  $D_t$  se obtiene de la ecuación anterior. Posteriormente a partir de este

coeficiente se puede hallar el radio hidrodinámico ( $R_H$ ) mediante la ecuación (2) 29  
conocida como Stokes-Einstein (Bhattacharjee, 2016)

$$D_t = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_H} \quad (2)$$

Donde  $k_b$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura y  $\eta$  la viscosidad absoluta. Esto nos indica que los resultados con el DLS dependen de la temperatura, viscosidad, etc.

Cuando las NPs están en suspensión presentan una doble capa eléctrica de la cual depende la estabilidad de las NPs porque esta doble capa no permite que las NPs se aglomeren. La capa interna está compuesta predominantemente de iones o moléculas que tengan una carga contraria a la superficie de la NP (capa de Stern). Más allá de esta capa los efectos electrostáticos debido a la carga superficial disminuyen según la ley de Debye (Bhattacharjee, 2016).

En la medición del ZP el equipo emite un haz de láser hacia la muestra; pero éste se divide en dos, uno de ellos incide sobre la muestra y el otro se utiliza como haz de referencia. Cuando el haz que va hacia la muestra incide sobre ésta se produce una dispersión del haz, pero en este caso la luz dispersada va a tener una frecuencia diferente a la de la luz originalmente debido a que las NPs están en movimiento y este cambio de frecuencia es proporcional a la velocidad a la que se mueve las NPs. Por último, la luz dispersada por las NPs se combina ópticamente con el haz de referencia para determinar el desplazamiento Doppler. Finalmente, a partir de este

desplazamiento Doppler se deduce la magnitud de la velocidad (V) de las NPs y 30  
luego el ZP se calcula mediante V (Bhattacharjee, 2016).

La técnica de DLS, al igual que la espectroscopía UV-Vis, también nos da información acerca del tamaño de las NPs (Agnihotri et al., 2014) es por eso que se emplea frecuentemente para determinar si el tamaño de las NPs se ha modificado luego de su funcionalización (Rahme et al., 2013). Por otro lado, la técnica de ZP nos brinda información acerca de la carga superficial de las NPs y además nos permita saber si las NPs son estable (Rahme et al., 2013).

#### **4.4. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).**

Esta es una técnica espectroscópica empleada principalmente para la química de la superficie de los diferentes materiales y la cual es muy sensible pues detecta hasta el 0.1% de elementos en una superficie (Zhang & Cresswell, 2016). Se sabe que cada elemento de la tabla periódica tiene una energía de enlace diferente asociada con cada orbital atómico. Es por esta razón que la espectroscopía fotoelectrónica utiliza la fotoionización y también el análisis de la distribución de la energía cinética de los electrones emitidos para el estudio de composición y el estado de oxidación de los elementos en la superficie de la muestra (Zhang & Cresswell, 2016).

En esta técnica, lo primero es que el equipo irradia la muestra con un haz de rayos X (para esto las fuentes más comunes son las de Al K $\alpha$  y Mg K $\alpha$ ) el cual va a hacer que algunos electrones salgan de los átomos que se encuentran en la superficie de la muestra y el equipo finalmente va a medir la energía cinética y el número de electrones que escapan de los 0 a 10 nm superiores de la muestra, de esta forma se obtiene los espectros XPS (Korin, Froumin, & Cohen, 2017; Zhang & Cresswell,

2016). Es importante mencionar que para obtener un máximo recuento de electrones que son liberados de la superficie de la muestra es necesario un sistema de ultra alto vacío (UHV) (Korin et al., 2017). 31

Debido a que un elemento tiene una energía de enlace diferente, entonces al medir una muestra se producirá un conjunto de picos diferentes dependiendo de los elementos que estén presentes en esta muestra. Estos picos espectrales característicos corresponden a la configuración de los electrones dentro de los átomos (Zhang & Cresswell, 2016). El XPS se basa en el principio de fotón único de entrada y electrón de salida. La energía total del fotón se puede expresar mediante la siguiente ecuación (Zhang & Cresswell, 2016).

$$E_{\text{fotón}} = E_{\text{cinética}} + E_{\text{BE}} \quad (3)$$

$E_{\text{fotón}}$  es la energía de los fotones de la fuente de rayos X que usa el equipo,  $E_{\text{BE}}$  y  $E_{\text{cinética}}$  es la energía de enlace y cinética de los electrones, respectivamente. La ecuación (3) se puede reordenar para calcular la energía cinética y además introduciendo el factor de corrección del instrumento  $E_{\text{instrumento}}$  se obtiene la ecuación (4).

$$E_{\text{BE}} = E_{\text{fotón}} - (E_{\text{cinética}} - E_{\text{instrumento}}) \quad (4)$$

Con esta ecuación final se puede calcular la  $E_{\text{unión}}$  ya que la energía del fotón se conoce, la energía cinética se puede medir y el factor de corrección del instrumento es una constante (Zhang & Cresswell, 2016).

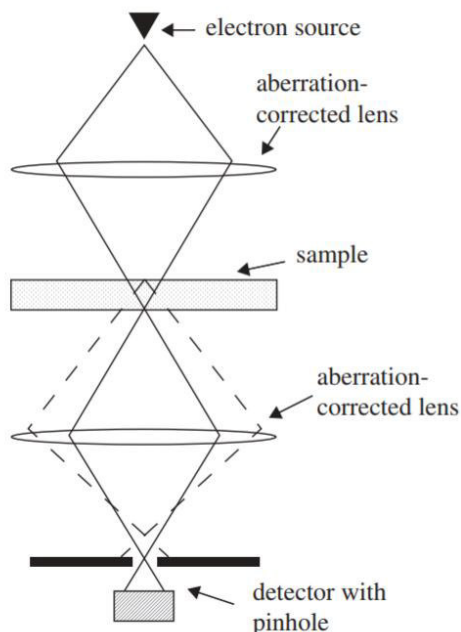
Al igual que la técnica de FTIR, la técnica de XPS también se emplea mucho 32

para hacer el seguimiento de la reacción click de Huisgen entre dos tipos diferentes de NPs funcionalizadas (Liu et al., 2016; Williams et al., 2016; Liu et al., 2013).

#### **4.5. Microscopio electrónico de transmisión (TEM)**

El microscopio electrónico de transmisión está compuesto de un sistema de iluminación, un sistema de lentes de objetivo, el sistema de amplificación, el sistema de registro de data y el sistema de análisis químico como se ve en la figura 11. La parte más importante en el sistema de iluminación es el cañón de electrones el cual puede ser producido por dos tipos de fuente generalmente. Una de ellas es la fuente de emisión termoiónica LaB<sub>6</sub> la cual proporciona una alta corriente de iluminación. Sin embargo, la densidad de corriente y la coherencia del haz no son tan altas. Por otro lado, está la fuente de emisión de campo la cual no presenta los problemas de la fuente de LaB<sub>6</sub> ya que ésta si tiene una densidad de corriente y coherencia del haz alta por lo que se le emplea cuando se trabaja en microanálisis de alta resolución (Wang, 2000). El principal componente del TEM es el lente objetivo ya que determina el límite de resolución de la imagen. Dentro del equipo hay lentes intermedios y de proyección que pertenecen al sistema de aumento y permiten un aumento de hasta 1,5 millones (Wang, 2000).





**Figura 10.** Esquema de un equipo TEM (Behan, Cosgriff, Kirkland, & Nellist, 2009)

Esta técnica es comúnmente usada para determinar el tamaño y la distribución de tamaños en las NPs. Para esto se tiene que tener un grupo representativo de imágenes. Posteriormente, se tiene que contar un número de NPs, idealmente unos miles, para que de esta forma se puede obtener una buena estadística del tamaño y distribución de tamaño (Collins, 2006). Como se ve, usar el TEM para hallar el tamaño y distribución de tamaños es una tarea tediosa y es por eso que para determinar estos parámetros se emplea comúnmente el DLS, aunque ya se tienen programas para hacer menos tedioso este trabajo. Sin embargo, a pesar de ser una técnica un poco trabajosa para medir dichos parámetros es más precisa que el DLS ya que se observa el tamaño real de las NPs.

Esta técnica también es usada para determinar el tamaño de las NPs (Agnihotri et al., 2014; Rahme et al., 2013), al igual que las tecnica de DLS y la de espectroscopía UV-Vis.

## Capítulo 2

### Objetivos

#### Objetivo General

- Sintetizar y caracterizar la funcionalización de las nanopartículas plata, su acoplamiento al péptido VIHGW-alquino-G-NH<sub>2</sub> y evaluar su capacidad antimicrobiana contra *E. coli*.

#### Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar AgNPs (0) esféricas de tamaños definidos
- Funcionalizar y caracterizar las AgNPs (0) con SH-PEG-N<sub>3</sub> (1000 Da).
- Acoplar las NPs metálicas funcionalizadas con el péptido VIHGW-alquino-G-NH<sub>2</sub>, mediante la reacción click.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de todos los materiales sintetizados contra *E. coli* mediante el método de conteo en placas.

## Parte Experimental

### 3.1 Materiales y equipos

Campana de flujo laminar (SterilchemGARD®III Advance, The Baker Company)

Autoclave (AVDA, Biogenics)

Agitador magnético múltiple (Bell-Ennium 5 position, Bellco Biotechnology)

Centrifuga refrigerada (Sorvall RT6000B Refrigerated Centrifuge)

Incubadora-Shaker (iEMS, Thermo scientific)

Shaker (Schuttler MTS 4, IKA)

Incubadora (Binder)

Micropipetas de 20, 200 y 1000 µL (Eppendorfs)

Nanodrop (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.)

Espectrofotómetro DLS (Wyatt Technology's Möbiuζ®)

Espectrofotómetro infrarrojo (IRTracer–100 FTIR, Shimadzu)

Espectrofotómetro fotoelectrónico de rayos X (PHI VersalProbe XPS Microprobe)

Microscopio electrónico de transmisión (FEI Tecna F30 300kV)

Erlenmeyer

Papel aluminio

### 3.2 Reactivos

*E. coli* (ATCC® 8739), Nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>, 99,8% - J.A. Elmer), citrato de sodio (99,9% - Movilab), Tiol-polietilenglicol-azida fue comprada en Biochempeg scientific (SH-PEG-N<sub>3</sub> 1kDa, >95% - Biochempeg scientific), ácido ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>OH, 99,7% -

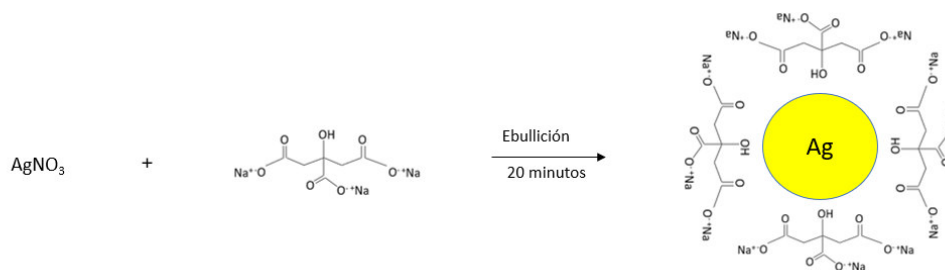
Fermont industries, Inc.), sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 99,0% - 36  
Millipore Sigma) y acetonitrilo (technical grade). El buffer fosfato (PB) se preparó al  
20mM usando fosfato de potasio di hidrógeno ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 99,5% - Merck) y fosfato de di-  
potasio hidrógeno ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 99,0% - Merck). El péptido VIHGW-alkyne-G- $\text{NH}_2$   
(sintetizado por el grupo de Alfredo Ángeles-Boza del departamento de química,  
Universidad de Connecticut). Este fue disuelto en una solución 1:1 acetonitrilo:PB (en  
volumen). Medio LB (Dibico), Agar MacConkey (número de catálogo DF0075-17-1,  
Fisher Scientific) y agua desionizada.

### 3.3 Metodología

#### 3.3.1 Síntesis de AgNPs mediante el método de Frens.

Las AgNPs se sintetizaron a través del método de Frens (Frens, 1973), utilizando plata en lugar de oro. Se colocaron 50 mL de  $\text{AgNO}_3$  a diferentes concentraciones (0,6; 0,8 y 1 mM) en un matraz Erlenmeyer con un agitador magnético. El matraz se cubrió con papel aluminio para poder trabajar en ausencia de la luz. Luego la solución se calentó hasta ebullición. Una vez que la solución alcanzó el punto de ebullición, se agregaron rápidamente 500  $\mu\text{L}$  de citrato de sodio 0,189 M y se agitó vigorosamente. Cada 5 min se sacó una pequeña cantidad de muestra para analizarlo con el equipo nanodrop 1000. Se hicieron 6 repeticiones por cada tiempo. Después, cuando se obtuvo el tiempo y concentración optima la solución amarilla se centrifugó a 5000 RPM durante 30 minutos y se resuspendió en agua desionizada. Finalmente, las AgNPs se guardaron a 4 ° C.

Las NPs fueron caracterizadas mediante espectroscopía UV-Vis, DLS, ZP, XPS y FTIR.

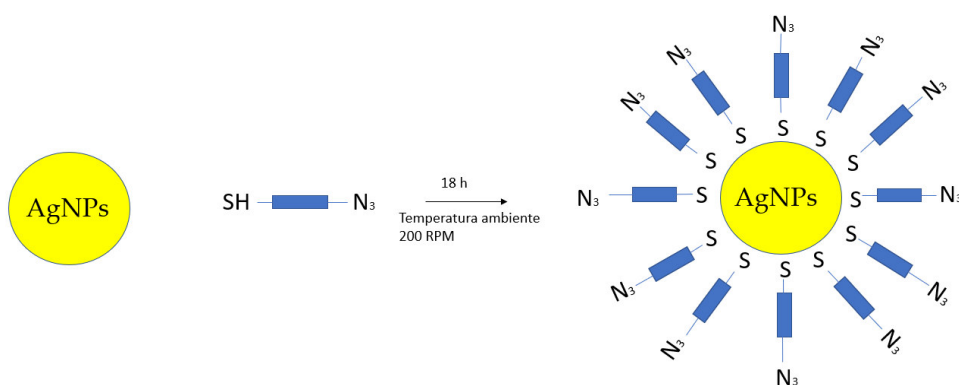


**Figura 11.** Esquema de la síntesis de AgNPs usando citrato de sodio (fuente propia).

### 3.3.2 Funcionalización de las AgNPs

La funcionalización con SH-PEG-N<sub>3</sub> se realizó según el método descrito por Brennan et al. (Brennan et al., 2006). Se pesaron 1, 2, 3, 4 y 5 mg de SH-PEG-N<sub>3</sub> en viales, luego se agregó 1 mL de las AgNPs previamente sintetizadas en cada vial. Cada una se hizo por triplicado. Las soluciones se agitaron a 200 RPM a temperatura ambiente durante 18 horas. Después de eso, las soluciones se centrifugaron a 5000 RPM durante 30 minutos y se resuspendieron en agua desionizada. Finalmente, las soluciones coloidales de AgNPs en agua se almacenaron a 4 ° C en la oscuridad para un análisis adicional. Cada funcionalización se realizó por triplicado.

Las NPs funcionalizadas fueron caracterizadas mediante espectroscopía UV-Vis, DLS, ZP, XPS y FTIR.



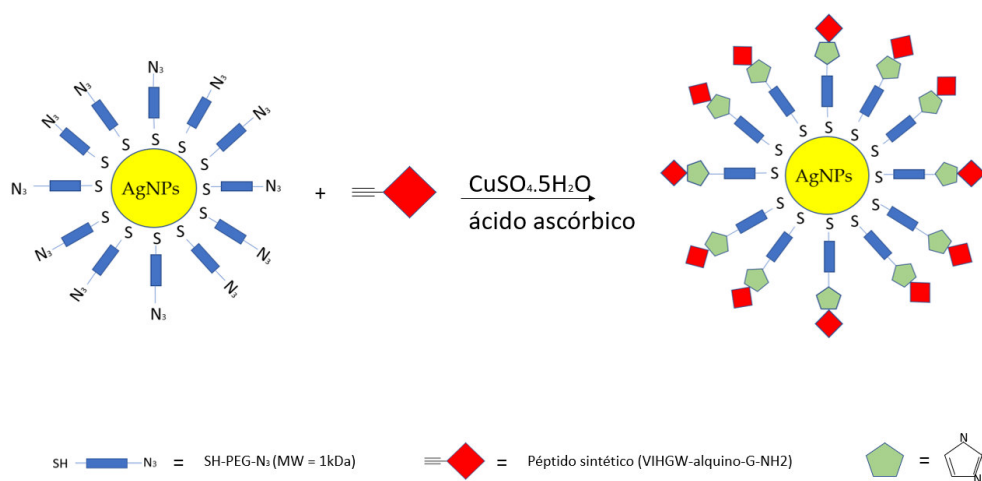
**Figura 12.** Esquema de la funcionalización de las AgNPs (fuente propia)

### 3.3.3 Acoplamiento del péptido con las AgNPs funcionalizadas

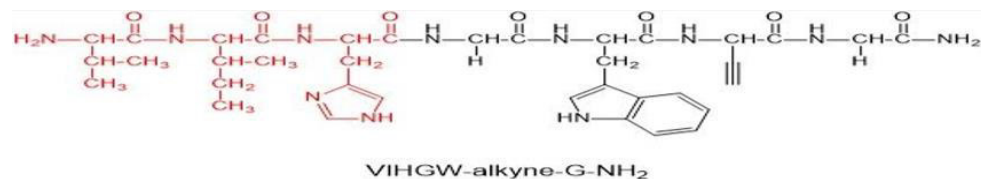
39

La carga de las AgNPs con el péptido sintético se realizó según el método descrito por Brennan et al. (Brennan et al., 2006)., en un vial se agregaron 190  $\mu\text{L}$  de AgNPs-S-PEG-N<sub>3</sub>, 100  $\mu\text{L}$  del péptido VIHGW-alquino-G-NH<sub>2</sub> (0,2 mM), cuya estructura se puede ver en la figura 14, 2,5  $\mu\text{L}$  de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (10 mM) y 2,5  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico (50 mM) y se completó con agua desionizada hasta 1 mL. Esta solución se agitó a 200 RPM a temperatura ambiente durante 3 días. Luego, la solución se centrifugó a 5000 RPM durante 30 minutos y se resuspendió en agua desionizada. Este paso se repitió 3 veces más para evitar los restos. Finalmente, la solución coloidal de AgNPs en agua se almacenó a 4 ° C en la oscuridad para un análisis adicional. El acoplamiento de las NPs funcionalizadas con el péptido se hizo por triplicado.

El producto final fue caracterizado mediante espectroscopía UV-Vis, DLS, ZP, XPS y FTIR.



**Figura 13.** Esquema del acoplamiento del péptido con las AgNPs funcionalizadas (fuente propia).



**Figura 14.** Estructura del péptido VIHWG-alquino-G-NH<sub>2</sub>

### 3.3.4 Ensayos antimicrobianos

Un pellet de *E. coli* (ATCC® 8739) se suspendió en PBS y se incubó por 30 min. Luego se plaqueó la solución de *E. coli* en una placa Petri con agar MacConkey y se dejó incubando por 24h. Posteriormente se inoculó el *E. coli* en 50 mL de medio LB y se incubó por 24 horas a 37 ° C. Después, el *E. coli* se purificó y se resuspendió en medio LB. La concentración inicial de *E. coli* fue de  $8,83 \times 10^9$  UFC / mL. Se realizaron cinco diluciones en medio LB. Se suspendió 50 µL de la quinta dilución en 1 mL de agua estéril desionizada suplementada con AgNPs, AgNPs-S-PEG-N<sub>3</sub>, AgNPs-S-PEG-péptido, péptido y N<sub>3</sub>-PEG-SH. La concentración de cada muestra en la suspensión fue de 200 µg / mL. Se contó el número de colonias en cada placa y se calculó la reducción logarítmica ( $\log_{10} (N_0 / N)$ ) donde  $N_0$  es el número de colonias en las bacterias no tratadas y N es el número de colonias que sobrevivieron a cada compuesto. La reducción logarítmica es un término matemático que se emplea para mostrar el número relativo de la reducción de microorganismos. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.



### 3.3.5 Purificación de *E. coli*

41

Para la purificación de *E. coli* primero se puso todo el material estéril y la cepa de *E. coli* en la cabina de flujo laminar. Luego en dos tubos Falcón de 50 mL se agregó 25 mL de caldo de *E. coli* en cada uno y se agregó agua desionizada estéril hasta que ambos tubos tengan el mismo peso. Después se cerraron herméticamente los tubos y se pusieron en el vortex por 30 segundos. Posteriormente, se centrifugó por 15 a 2100 RPM y 4 ° C. Una vez terminada la centrifugación se descartó el sobrenadante y se agregó 30 mL de agua desionizada estéril y se repitió todo el proceso anterior 2 veces más. Luego de la última centrifugada en vez de resuspender el *E. coli* en agua desionizada se resuspendió en medio LB y se guardó a 4 ° C para ser usado posteriormente.

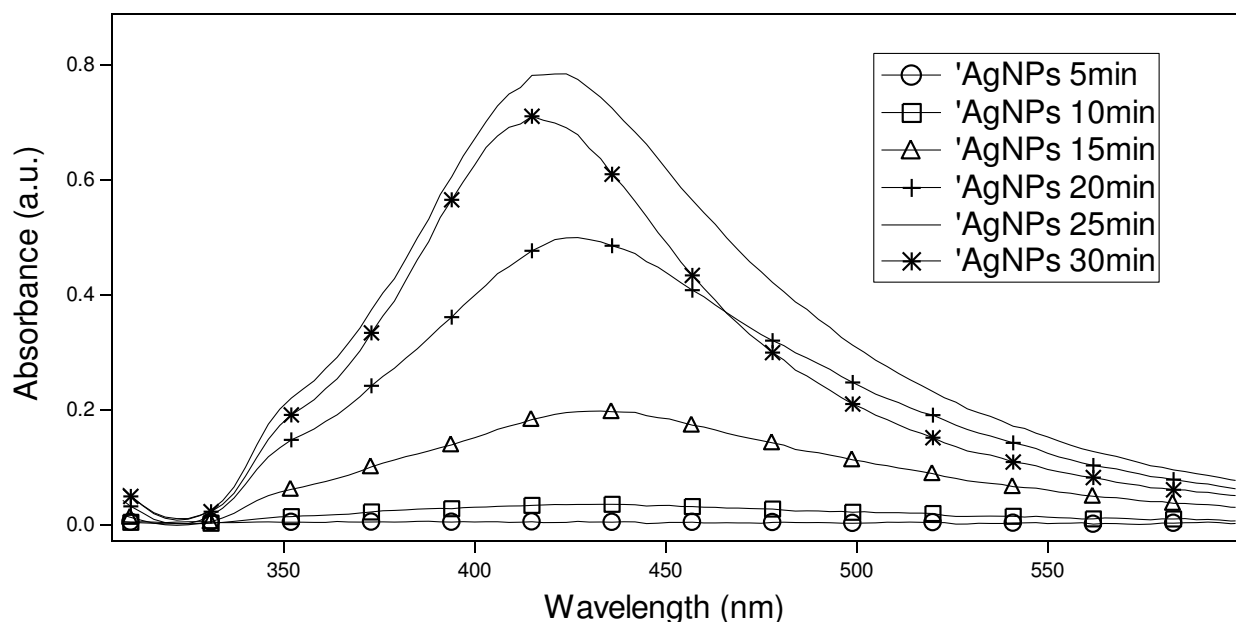
### 3.3.6 Caracterización

Para la medición del espectro UV-Vis se usó el nanodrop, en el cual se agregó una gota de la muestra sin realizarle ningún tratamiento adicional. Para la medición en el DLS la muestra se agregó en una celda de plástico y se colocó en el equipo también sin realizarle ningún tratamiento adicional. Para la medición del ZP la suspensión de NPs se diluyó en 9 veces su concentración y luego se agregó 65 µL de la suspensión diluida a celda mobius dip y esta se colocó en el equipo para su medición. Para la medición en el FTIR, la suspensión primero fue evaporada en vacío sobre papel aluminio y luego se hizo la medición mediante el ATR. Para la medición en el XPS la suspensión se evaporó en vacío sobre una placa de silica y luego se midió. Para la medición en el TEM primero se colocó 20 µL la muestra

en una rejilla de cobre recubierta con una película de carbono Lacey y se incubó<sup>42</sup> durante 60 segundos. Después la muestra se colocó en el TEM y se midió.

### Discusión de Resultados

Para los ensayos de optimización, se evaluó la influencia de la concentración de nitrato de plata y también el tiempo de reacción de la mezcla. La primera prueba se realizó con una concentración de 0,6 mM de  $\text{AgNO}_3$  y se analizaron muestras cada 5 min para obtener el tiempo de reacción óptimo. En este caso, como se observa en la Figura 15, los tiempos de reacción óptimos podrían ser a los 20 o 25 min ya que en ambos casos la banda del plasmón superficial presenta una mayor absorbancia lo que indica una mayor concentración de NPs que es lo que se está buscando. Sin embargo, la Tabla 1 muestra que el tiempo de reacción más óptimo sería el de 20 min ya que se logra una mejor reproducibilidad en cuanto a la absorbancia, que en este caso es el parámetro más determinante pues se requiere tener un adecuado control sobre el tamaño de las NPs. Además, entre el tiempo 20 y 25 min la longitud de onda máxima que indica el tamaño de las NPs, no varía significativamente (Agnihotri et al., 2014). También se puede observar que entre el tiempo de 20 min y 25min el FWHM estadísticamente no varia.



**Figura 15.** Espectros UV-VIS de las AgNPs sintetizadas usando  $\text{AgNO}_3$  a 0,6 mM

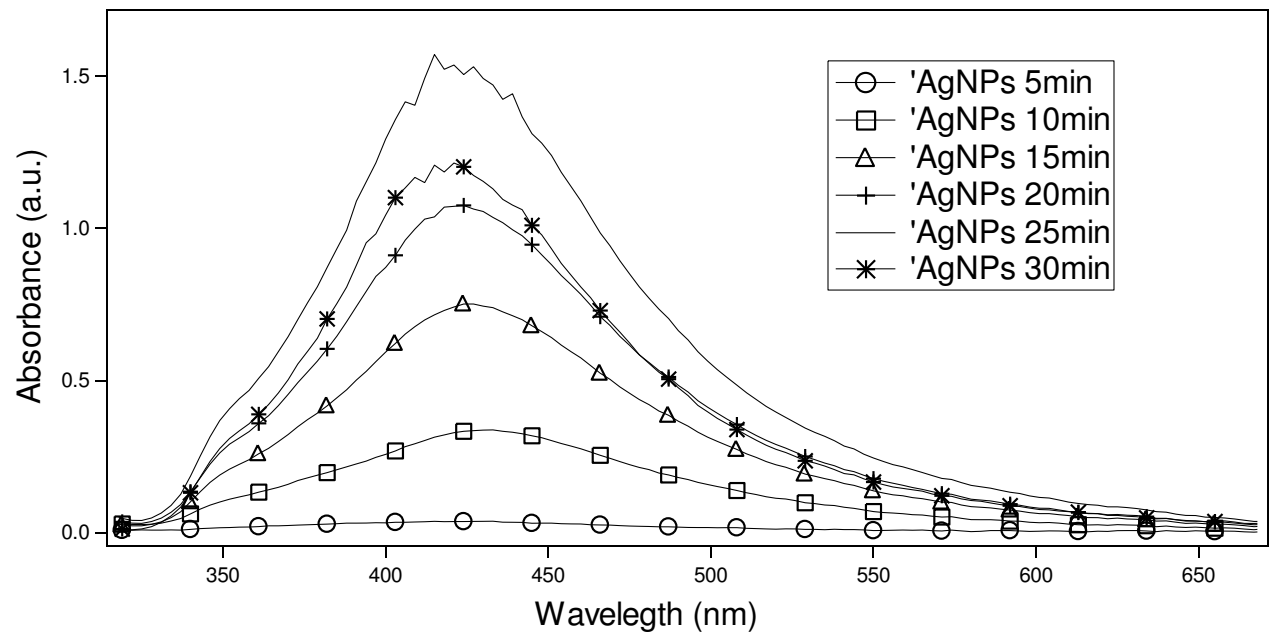
**Tabla 1**

*Parámetros de longitud de onda máxima, la absorbancia a esta longitud de onda y el FWHM para la síntesis de AgNPs usando  $\text{AgNO}_3$  a 0,6 mM.*

Tiempo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Absorbancia	FWHM (nm)
5min	-	-	-
10min	$432,8 \pm 8,2$	$0,04 \pm 0,03$	-
15min	$433,3 \pm 5,9$	$0,2 \pm 0,2$	$160 \pm 30.3$
20min	$428,3 \pm 7,0$	$0,5 \pm 0,2$	$119 \pm 7.5$
25min	$420,0 \pm 5,0$	$0,8 \pm 0,4$	$109 \pm 13.5$
30min	$416,8 \pm 3,4$	$0,7 \pm 0,4$	$108 \pm 15.0$

A continuación, se varió la concentración del  $\text{AgNO}_3$  a 0,8 mM y en este caso el tiempo óptimo se determinó en el rango de 15 – 20 min como se observa en la Figura 16. A pesar que la banda del plasmón superficial en este rango de tiempo no es la mayor, se escogió como el más óptimo debido a que a mayor tiempo los espectros presentan picos en la longitud de onda máxima lo que no permite una buena caracterización de las NPs, esto se puede deber a que la concentración es muy grande para el instrumento que se está empleando, en este caso el

nanodrop. En este caso, el tiempo de 25 min no es adecuado ya que como se observa las NPs 45 ya se comienzan a agregar y es por esa razón que el pico a este tiempo no se muestra tan definido como en el de los otros casos. De la Tabla 2 se observa que el tiempo óptimo para este caso es de 15 min, ya que se logra una mejor reproducibilidad tanto en la absorbancia como en la longitud de onda máxima.



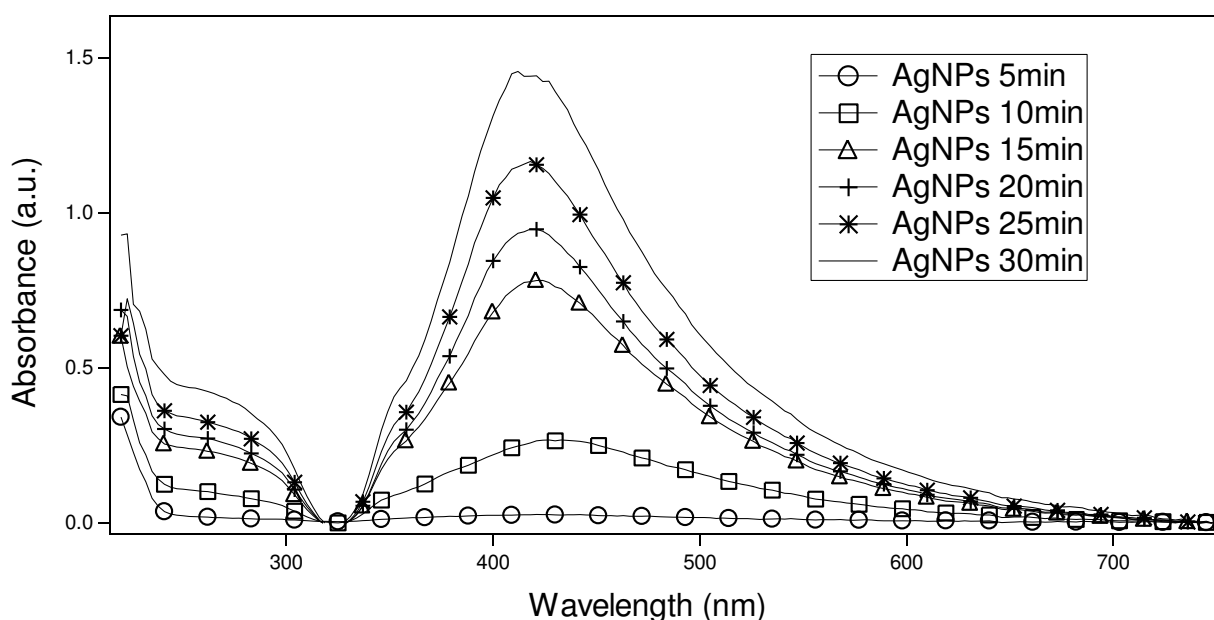
**Figura 16.** Síntesis de AgNPs usando  $\text{AgNO}_3$  a 0,8 mM

**Tabla 2**

*Parámetros de longitud de onda máxima, la absorbancia a esta longitud de onda y el FWHM para la AgNPs de plata usando  $\text{AgNO}_3$  a 0,8 mM.*

Tiempo (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Absorbancia	FWHM (nm)
5	-	-	-
10	$431,8 \pm 1,5$	$0,3 \pm 0,3$	$137 \pm 13,5$
15	$429,0 \pm 4,0$	$0,8 \pm 0,4$	$119 \pm 20,0$
20	$424,5 \pm 5,2$	$1,1 \pm 0,4$	$111 \pm 13,1$
25	-	-	-
30	-	-	-

Por último, se varió la concentración del  $\text{AgNO}_3$  nuevamente, pero esta vez a 1 mM y, como se observa en la Figura 17, los tiempos óptimos serían 20 o 25 min. En este caso al igual que en el anterior no se escogió el tiempo de 30 min, a pesar de que la banda del plasmón superficial presenta una mayor absorbancia, debido a que la longitud de onda máxima no está bien definida. Sin embargo, de Tabla 3 se observa que el tiempo óptimo sería el de 20 minutos puesto que se logró una mejor reproducibilidad en cuanto a la absorbancia.

**Figura 17.** Síntesis de AgNPs usando  $\text{AgNO}_3$  a 1 mM

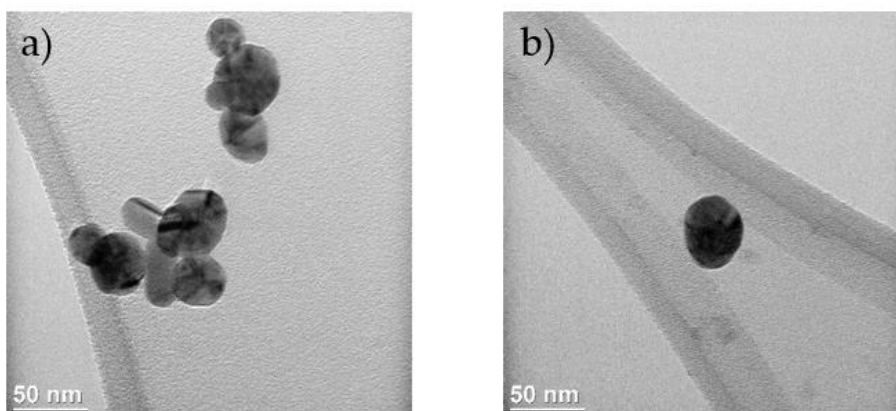
**Tabla 3**

*Parámetros de longitud de onda máxima, la absorbancia a esta longitud de onda y el FWHM para la síntesis de AgNPs usando  $\text{AgNO}_3$  a 1 mM.*

Tiempo (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Absorbancia	FWHM (nm)
5	-	-	-
10	$429,6 \pm 5,0$	$0,3 \pm 0,1$	$149 \pm 9,9$
15	$418,8 \pm 4,5$	$0,8 \pm 0,1$	$124 \pm 11,6$
20	$417,5 \pm 3,8$	$0,9 \pm 0,1$	$116 \pm 12,1$
25	$418,8 \pm 2,9$	$1,2 \pm 0,2$	$114 \pm 13,1$
30	-	-	-

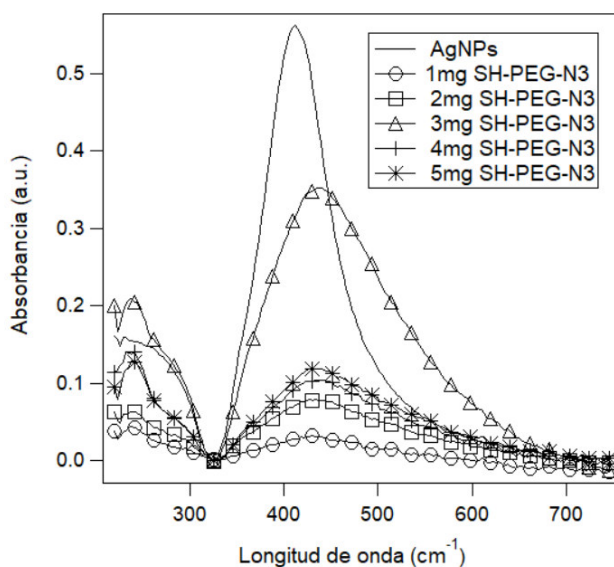
Por lo tanto, comparando la información de las Tablas 1, 2 y 3 se puede observar que la concentración de  $\text{AgNO}_3$  necesaria para lograr una buena concentración de AgNPs con una reproducibilidad adecuada es de 1 mM y el tiempo óptimo de reacción es de 20 min, porque a esta concentración y a este tiempo de reacción la desviación estándar para el caso de la absorbancia baja, lo que nos indica que si hay una reproducibilidad y en cuanto a la desviación estándar de la longitud de onda éste no afecta significativamente el tamaño de las NPs.

En la figura 18 se observa las AgNPs antes y después de ser funcionalizadas y también se puede observar que el tamaño de las AgNPs no se modifica.



**Figura 18.** TEM de las NPs. (a) Antes y (b) después de la funcionalización.

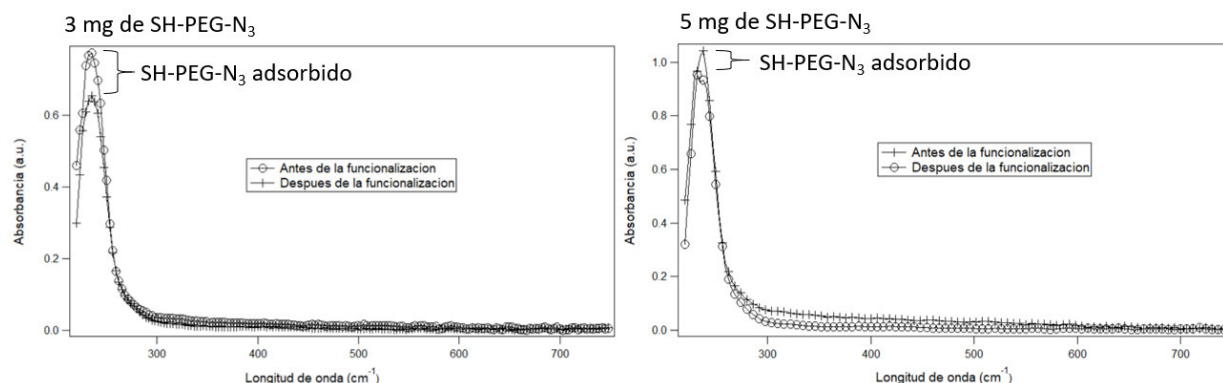
Para la funcionalización de las AgNPs se probaron diferentes cantidades de la molécula para optimizar el proceso y lograr obtener la mayor cantidad de moléculas sobre las NPs. La absorción de luz debido al efecto SPR característica de las AgNPs y su variación debido a la adición de diferentes cantidades de SH-PEG-N<sub>3</sub> se obtuvieron mediante espectroscopía UV-Vis como se muestra en la Figura 19. Cuando las AgNPs están funcionalizadas, se observa un desplazamiento hacia el rojo además de un aumento en el ancho total a la mitad máximo (FWHM). Según los informes anteriores encontrados en la literatura (Foerster et al., 2017), un aumento en la variación de FWHM y desplazamiento hacia el rojo indica un aumento en la carga de la molécula de recubrimiento. Como puede verse en la Figura 20, el mayor aumento de FWHM y desplazamiento hacia el rojo se obtiene a una concentración de 3 mg / mL de SH-PEG-N<sub>3</sub>; por lo tanto, se puede considerar que la carga más alta se logra utilizando esta cantidad.



**Figura 19.** Espectro UV-Vis para mostrar la modificación de la banda del plasmón superficial en función de la cantidad de SH-PEG-N<sub>3</sub> usada en la funcionalización de las AgNPs.

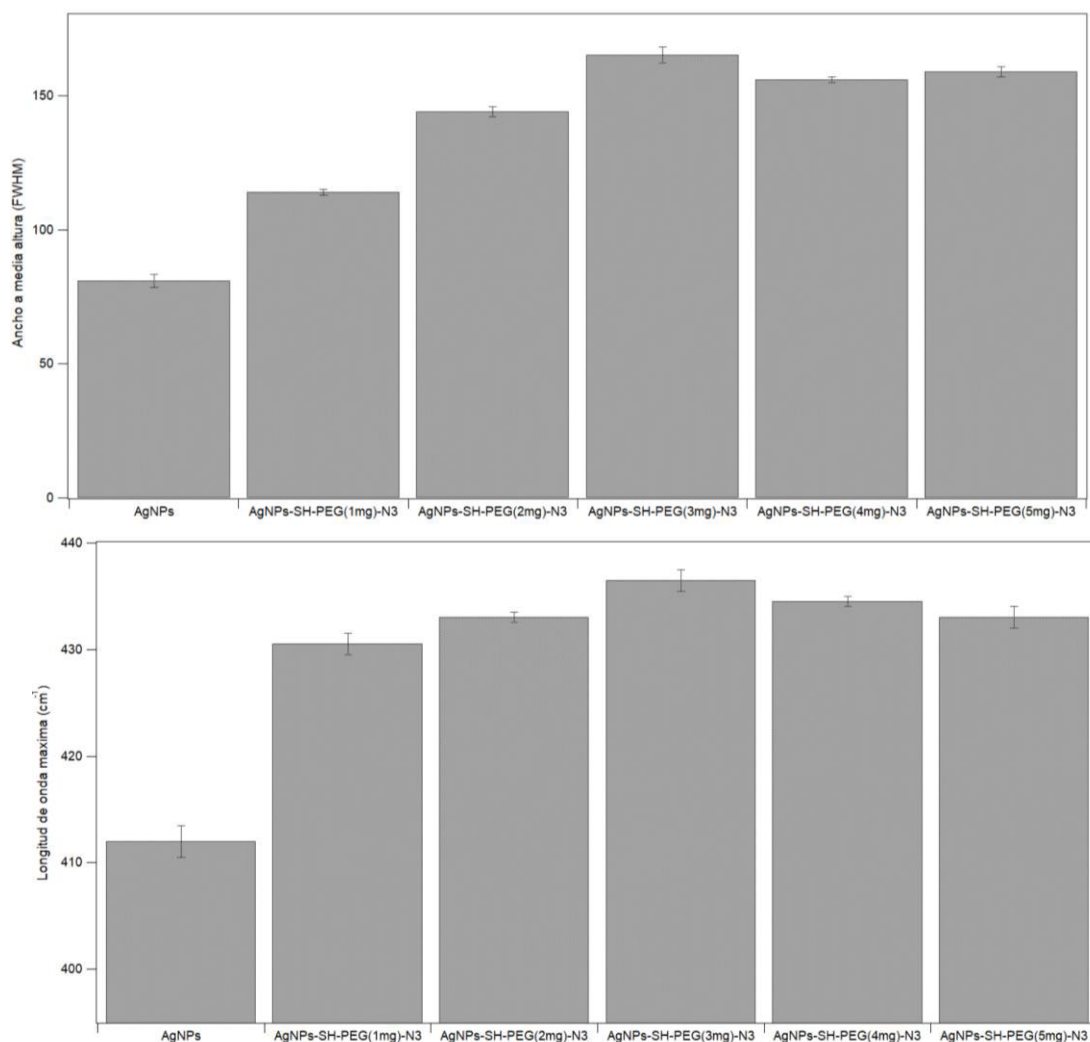


Además, de figura 20 se observa que en 3 mg de SH-PEG-N<sub>3</sub> hay más moléculas que se cargan en las AgNPs que en 5 mg. Esto puede ser posible porque en 3 mg hay más interacción entre las NPs y el enlazador. Sin embargo, en 5 mg, es posible que la interacción no fuera favorable, puesto que hubo más interacción entre las partículas que las NPs con la molécula de SH-PEG-N<sub>3</sub>.



**Figure 20.** Espectros UV-VIS antes y después de la Funcionalización de las AgNPs con el enlazador (SH-PEG-N<sub>3</sub>). Izquierda. cuando se usó 3 mg de SH-PEG-N<sub>3</sub>. Derecha. cuando se usó 5 mg de SH-PEG-N<sub>3</sub>.

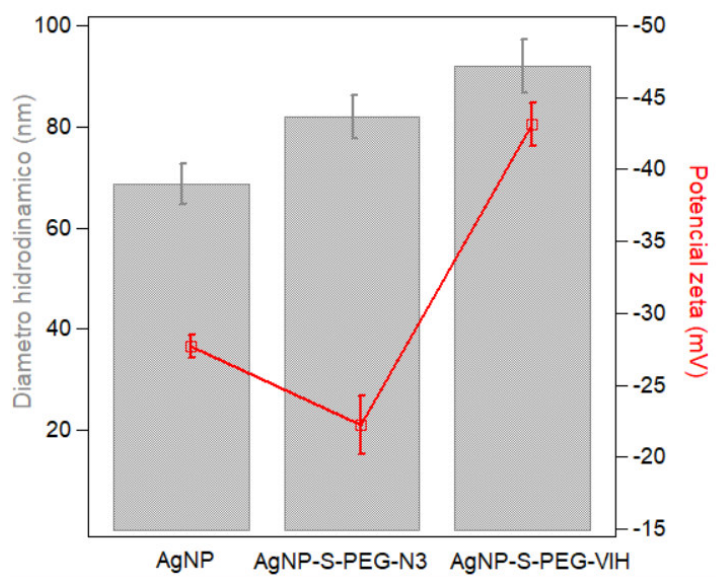
Hay algunas explicaciones que se pueden dar para cuando se usan diferentes cantidades de SH-PEG-N<sub>3</sub>. Para cantidades inferiores a 3 mg / mL, la molécula que se une a las NPs adquiere una conformación de "hongo" (Rahme et al., 2013). Con esta conformación, cada molécula ocupa más espacio que la conformación del "cepillo",



**Figura 21.** Variación del ancho total en la mitad máxima (FWHM) de la SRP usando cantidades diferentes de SH-PEG-N<sub>3</sub> (arriba) y la variación del desplazamiento al rojo de la SRP usando una cantidad diferente de SH-PEG-N<sub>3</sub> (abajo).

evitando que la otra molécula se una a las NPs. Para cantidades superiores a 3 mg / mL, la interacción entre las NPs y SH-PEG-N<sub>3</sub> cambia porque hay una cantidad excesiva de moléculas de SH-PEG-N<sub>3</sub> para interactuar con las NPs. En Figura 22 se observa que después de la funcionalización las NPs aumentan su diámetro hidrodinámico y esto significa que la molécula SH-PEG-N<sub>3</sub> se ha unido a la NP (Rahme et al., 2013). Además, después de la reacción click, el radio hidrodinámico también aumente lo que significa que si a habido un acoplamiento entre el

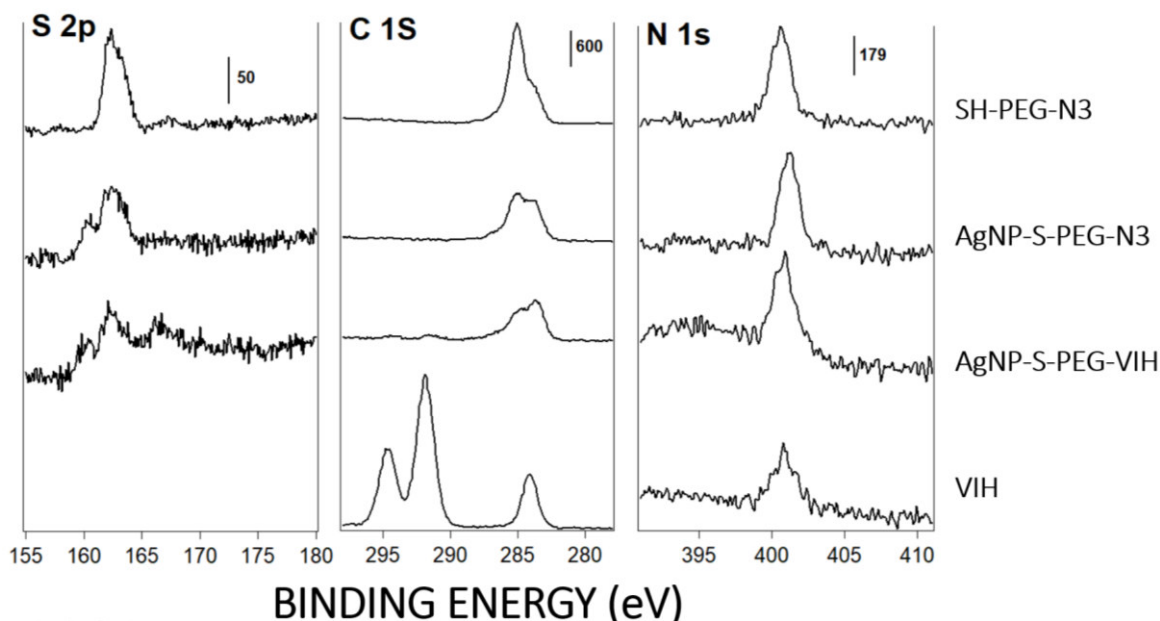
péptido y las NPs funcionalizadas. De la Figura 22 también se observa que el ZP después de la 51 funcionalización disminuye, esto debido a que el linker es una molécula neutra. Sin embargo, las NPs funcionalizadas siguen siendo estables ya que su zeta potencial permanece en el rango de 20-30 mV (Bhattacharjee, 2016). Por otro lado, después de la reacción click, el ZP aumenta, así como la estabilidad de las NPs (Bhattacharjee, 2016).



**Figura 22.** Variación del diámetro hidrodinámico de las NPs después de la funcionalización y la reacción click (gris) y la variación del ZP después de la funcionalización y la reacción click (rojo).

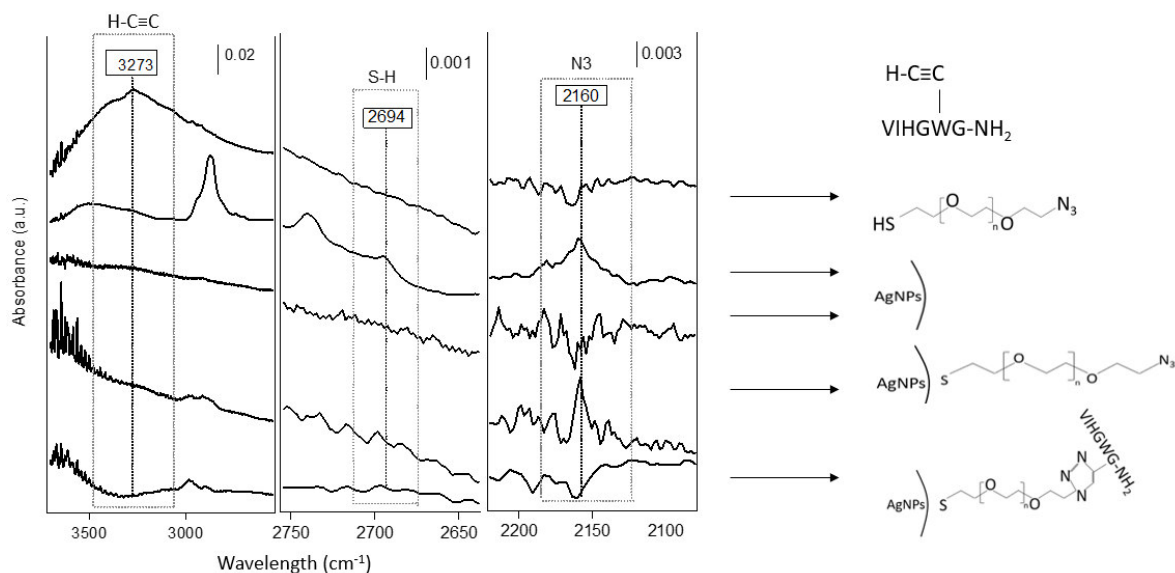
Se realizó el análisis por XPS para probar la unión entre las NPs y SH-PEG-N<sub>3</sub>. Para los propósitos de este estudio, se necesitaba la unión de SH-PEG-N<sub>3</sub> sobre la superficie de las NPs a través del lado tiol. El primer espectro de la Figura 23 muestra un gran pico a 162 eV, el cual es el pico del grupo tiol en la molécula SH-PEG-N<sub>3</sub>. Los espectros inferiores de la Figura 23 muestran un pico a 160 eV, característico de los sulfuros metálicos. Esto significa que el grupo tiol en el SH-PEG-N<sub>3</sub> se ha unido a las NPs. El pico remanente a 162 eV indica que no todas las moléculas de SH-PEG-N<sub>3</sub> se han unido a las AgNPs. El espectro inferior de la Figura 23 indica que después de la reacción click, la unión entre las NPs y SH-PEG-N<sub>3</sub> no se rompió ya que el

pico a 160 eV todavía está presente. Sin embargo, en este espectro aparece otro pico a 166,5 52 eV y la intensidad del pico a 162 eV disminuye. Estos cambios indican la oxidación de algunas moléculas que no estaban unidas. Además, la Figura 23 en la región C 1S de la AgNP-S-PEG-VIH muestra que el péptido sintético se unió a las NPs ya que en este espectro hay tres picos en la misma posición que los picos que aparecen en el espectro del VIH. Esperábamos ver dos picos en la región N 1s del SH-PEG-N<sub>3</sub> porque es característico del grupo azida. Sin embargo, en este espectro solo hay un pico y la explicación se puede deber a que la muestra se preparó en Perú, pero la medición del XPS se realizó en Cleveland. Por lo tanto, es posible que el grupo azida haya desaparecido ya que es muy reactivo y además se sabe que medir grupos nitrogenados con el XPS no es sencillo ya que no dan señales muy pronunciadas.



**Figura 23.** XPS para seguir el acoplamiento entre AgNPs con SH-PEG-N<sub>3</sub>. A la izquierda está la región S 2p, el centro es la región C 1S y la derecha es la región N 1S. El orden va de arriba a abajo de los espectros XPS. SH-PEG-N<sub>3</sub> utilizando como enlazador entre las NPs y el péptido. AgNPs funcionalizadas con SH-PEG-N<sub>3</sub>. Las AgNPs funcionalizadas después de la reacción clic. Péptido sintético (VIHGW-alquino-G-NH<sub>2</sub>).

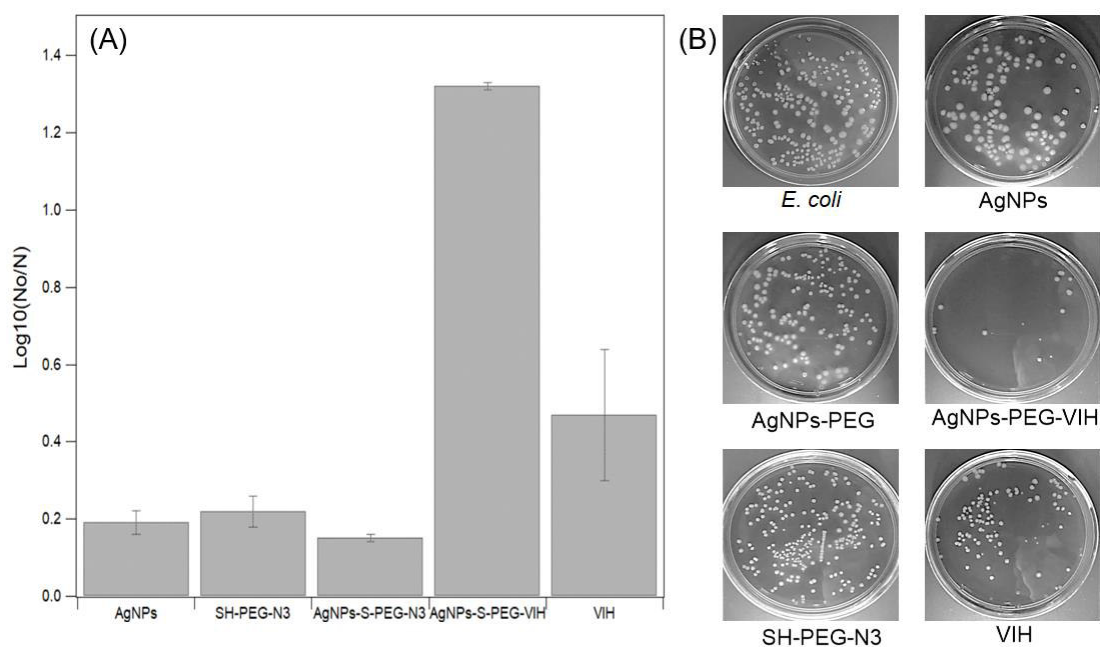
éxito, debido a la baja intensidad de la señal N 1s. Sin embargo, ATR-FTIR detecta mejor la presencia del grupo azida y, por lo tanto, se utilizó para demostrar que la reacción clic si se produjo. En la región de la azida en la figura 24 de la AgNP-S-PEG-N<sub>3</sub> se observa un pico intenso a 2160 cm<sup>-1</sup>, el cual es totalmente consistente con el estiramiento del grupo funcional azida presente en SH-PEG-N<sub>3</sub>. En la región de la azida en la Figura 24 de la AgNP-S-PEG-VIH se observa el espectro después de hacer la reacción click, el pico de azida desaparece por completo, lo que significa que toda la terminación de azida ha reaccionado con el grupo alquino del péptido. De la misma forma en la regio  $\equiv\text{C-H}$  se puede observar que el espectro del péptido solo si presenta la banda característica del  $\equiv\text{C-H}$  pero luego de la reacción click esta banda desaparece. Lo que nos indica que la reacción click si se llevó a cabo.



**Figura 24.** FTIR para seguir el acoplamiento entre las AgNPs con SH-PEG-N<sub>3</sub>. A la izquierda está la región  $\equiv\text{C-H}$ , en el medio la región S-H y la derecha es la región N<sub>3</sub>. El orden va de arriba hacia abajo de los espectros FTIR. Péptido VIHGW-alkino-G-NH<sub>2</sub>, SH-PEG-N<sub>3</sub> utilizando como enlazador entre las NPs y el péptido. AgNPs. AgNPs funcionalizadas con SH-PEG-N<sub>3</sub>. AgNPs funcionalizadas después de la reacción click.

De la Figura 24 en la región SH se observa que el grupo tiol está presente en el enlazador (SH-PEG-N<sub>3</sub>). Se ve que luego de la funcionalización el pico a 2694 cm<sup>-1</sup> desaparece lo que significa que el enlace SH se rompió y se origina un enlace entre el azufre y la plata. 54

Es notorio que la actividad antimicrobiana del producto final AgNPs-S-PEG-VIH aumenta respecto a la de sus componentes. La Figura 25 muestra que el enlazador no afecta la actividad antimicrobiana de los AgNPs. Además, se muestra que cuando las NPs se unieron con el péptido (VIHGW- (alquino) -G-NH<sub>2</sub>), la reducción del Log es de aproximadamente 1 Log<sub>10</sub>. Lo que significa en otras palabras que se ha reducido en número de microorganismos en una superficie en 10 veces. Esta reducción es mayor que cada uno de los reactivos utilizados para sintetizar el producto final por separado. Finalmente, la Figura 25 muestra que se produjo un efecto sinérgico entre los AgNPs y el péptido, ya que la reducción Log del producto final AgNPs-PEG-VIH es el doble de la suma de la reducción Log de los AgNPs y el péptido por separado.



**Figura 25.** (A) Reducción logarítmica de cada compuesto y (B) Placas de agar con *E. coli* tratadas con cada compuesto. La concentración de *E. coli* fue de  $8,83 \times 10^9$  UFC / mL y la concentración de cada compuesto fue de 200  $\mu$ g / mL

## Conclusiones

Comparando la información de las Tablas 1, 2 y 3 se puede observar que la concentración de  $\text{AgNO}_3$  necesaria para lograr una buena concentración de AgNPs con una reproducibilidad adecuada es de 1 mM y el tiempo óptimo de reacción es de 20 min, puesto que a esta concentración y a este tiempo de reacción la desviación estándar para el caso de la absorbancia baja lo que nos indica que si hay una reproducibilidad y en cuanto a la desviación estándar de la longitud de onda este no afecta significativamente el tamaño de las NPs. La cantidad adecuada de SH-PEG- $\text{N}_3$  para tener un máximo de carga sobre las AgNPs es de 3 mg. La reacción entre la molécula SH-PEG- $\text{N}_3$  y las AgNPs se dio mediante el lado terminal SH de la molécula espaciado y esto se pudo demostrar mediante análisis por XPS porque en el espectro XPS después de la funcionalización se observa un pico a 160eV característico de los sulfuros metálicos. Esta interacción entre el grupo SH y las AgNPs también se observaron mediante el análisis mediante FTIR, en donde después de la funcionalización la banda a  $2694\text{ cm}^{-1}$ , característico del SH, ya no presenta una señal lo que significa que el enlace azufre hidrogeno se rompió. Y por el análisis con FTIR también se demostró que el péptido reacciona con las AgNPs-S-PEG- $\text{N}_3$  mediante la reacción click, ya que la banda a  $2160\text{ cm}^{-1}$ , característico del grupo  $\text{N}_3$ , no presenta una señal después de la reacción entre el péptido y las AgNPs-S-PEG- $\text{N}_3$ . Por último, mediante las pruebas antibacteriales en placas se pudo observar que el producto final AgNPs-S-PEG-VIH presenta una mayor actividad antibacterial que sus componentes por separado.



### Referencias Bibliográficas

- Abou El-Nour, K. M. M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A., & Ammar, R. A. A. (2010). Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(3), 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.008>
- Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.*, 4(8), 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/C3RA44507K>
- Antiochia, R., Bollella, P., Favero, G., & Mazzei, F. (2016). Nanotechnology-Based Surface Plasmon Resonance Affinity Biosensors for In Vitro Diagnostics. *Int J Anal Chem*, 2016, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/2981931>
- Aubin-Tam, M.-E., Hwang, W., & Hamad-Schifferli, K. (2009). Site-directed nanoparticle labeling of cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4095–4100. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807299106>
- Baskin, J. M., Prescher, J. A., Laughlin, S. T., Agard, N. J., Chang, P. V., Miller, I. A., Bertozzi, C. R. (2007). Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 16793–16797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707090104>
- Behan, G., Cosgriff, E. C., Kirkland, A. I., & Nellist, P. D. (2009). Three-dimensional imaging by optical sectioning in the aberration-corrected scanning transmission electron microscope, 3825–3844. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0074>
- Beyth, N., Hourri-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W., & Hazan, R. (2015). Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials, 2015, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2015/246012>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Biju, V. (2014). Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chem. Soc. Rev.*, 43(3), 744–764. <https://doi.org/10.1039/C3CS60273G>
- Boisseau, P., & Loubaton, B. (2011). Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique*, 12(7), 620–636. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2011.06.001>
- Boisselier, E., Salmon, L., Ruiz & Astruc, D. (2008). How to very efficiently functionalize gold nanoparticles by “click” chemistry. *Chemical Communications*, (44), 5788–5790. <https://doi.org/10.1039/b812249k>
- Brennan, J. L., Hatzakis, N. S., Tshikhudo, T. R., Dirvianskyte, N., Razumas, V., Patkar, S., Vind, J., Svendsen, A., Nolte, R. J. M., Rowan, A., Brust, M. (2006). Bionanoconjugation via click chemistry: The creation of functional hybrids of lipases and gold nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, 17, 1373–1375. <https://doi.org/10.1021/bc0601018>
- Brinckerhoff, L. H., Kalashnikov, V. V., Thompson, L. W., Yamshchikov, G. V., Pierce, R. A., Galavotti, H. S., Engelhard, V. H., Slingluff, C. L. (1999). Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-127-35 peptide: Implications for peptide vaccines. *International Journal of Cancer*, 83(3), 326–334. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19991029\)83:3<326::AID-IJC7>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19991029)83:3<326::AID-IJC7>3.0.CO;2-X)
- Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., & Whyman, R. (1994). Synthesis of Thiol-

- derivatised Gold Nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 801–802. <https://doi.org/10.1039/C39940000801>.
- Casciaro, B., Moros, M., Rivera-Fernández, S., Bellelli, A., de la Fuente, J. M., & Mangoni, M. L. (2017). Gold-nanoparticles coated with the antimicrobial peptide esculentin-1a(1-21)NH<sub>2</sub> as a reliable strategy for antipseudomonal drugs. *Acta Biomaterialia*, 47, 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.041>
- Collins, F. (2006). Analysis of Nanoparticle Transmission Electron Microscopy Data Using a Public- Domain Image-Processing Program , *Image*, 30, 1–13.
- Drechsler, U., Fischer, N. O., Frankamp, B. L., & Rotello, V. M. (2004). Highly Efficient Biocatalysts via Covalent Immobilization of *Candida rugosa* Lipase on Ethylene Glycol-Modified Gold–Silica Nanocomposites. *Advanced Materials*, 16(3), 271–274. <https://doi.org/10.1002/adma.200306022>
- Feynman, R. P. (1992). There is Plenty of Room at the Bottom. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 1(1), 60–66. <https://doi.org/10.1109/84.128057>
- Fleming, D. A., Thode, C. J., Williams, M. E. (2006). Triazole Cycloaddition as a General Route for Functionalization of Au Nanoparticles. *Chem. Mater.*, (12), 2327–2334. <https://doi.org/10.1021/cm060157b>.
- Foerster, B., Joplin, A., Kaefer, K., Celiksoy, S., Link, S., & Sönnichsen, C. (2017). Chemical Interface Damping Depends on Electrons Reaching the Surface. *ACS Nano*, 11(3), 2886–2893. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08010>
- Frens, G. (1973). Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science*, 241(105), 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
- Garcia, M. A. (2011). Surface Plasmons in metallic nanoparticles: Fundamentals and applications. *J. Phys. D: Appl. Phys*, 45, 1-20.
- Greg T. Hermanson. (2008). *Bioconjugate Techniques*, Illinois, Elsevier.
- Guo, D., Xie, G., & Luo, J. (2014). Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47(1), 13001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/47/1/013001>
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., Aberasturi, D. J. De, Larramendi, I. R. De, & Rojo, T. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>
- Han, J. W., & Kim, J. (2012). Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*, *International Journal of medicine*, 2012:7, 5901-5914. <https://doi.org/10.2147/IJN.S37397>
- Haruta, M., & Daté, M. (2001). Advances in the catalysis of Au nanoparticles, *Applied catalysis A: General*, 222, 427–437. [https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(01\)00847-X](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(01)00847-X)
- Hiroshi Nikaido. (2010). Multidrug Resistance in Bacteria, *Annu Rev Biochem.*, 78, 119–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>.
- Hsueh, P. (2010). New Delhi Metallo-  $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1): *Journal of the Formosan Medical Association*, 109(10), 685–687. [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(10\)60111-8](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(10)60111-8)
- Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical*

- Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05> 59
- Jung, A., & Jik, Y. (2011). “ Nanoantibiotics ”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156(2), 128–145. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>
- Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H., & Park, Y. H. (2008). Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Applied and environmental microbiology*, 74(7), 2171–2178. <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07>
- Kim, Y.-P., Daniel, W. L., Xia, Z., Xie, H., Mirkin, C. a, & Rao, J. (2010). Bioluminescent nanosensors for protease detection based upon gold nanoparticle-luciferase conjugates. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 46(1), 76–78. <https://doi.org/10.1039/b915612g>
- Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., & Plech, A. (2006). Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>
- Knetsch, M. L. W., & Koole, L. H. (2011). New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers*, 3(1), 340–366. <https://doi.org/10.3390/polym3010340>
- Kocbek, P., Cegnar, M., Kos, J., & Kristl, J. (2007). Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody, 120, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.03.012>
- Korin, E., Froumin, N., & Cohen, S. (2017). Surface Analysis of Nanocomplexes by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 3(6), 882–889. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00040>
- Kumaran, R. S., Choi, Y., Singh, V., & Song, H. (2015). In Vitro Cytotoxic Evaluation of MgO Nanoparticles and Their Effect on the Expression of ROS Genes, *Int. J. Mol. Sci*, 16(4), 7551–7564. <https://doi.org/10.3390/ijms16047551>
- LaMer, V., & Dinegar, R. (1950). Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *Journal of the American Chemical*, 72(8), 4847–4854. <https://doi.org/10.1021/ja01167a001>
- Laxminarayan, R. (2014). Economic burden of antibiotic resistance: how much do we really know?. *Clinical Microbiology and infection*, 20, 973–980. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12798>
- Lee, B., Park, J., Ryu, M., Kim, S., Joo, M., Yeom, J.-H., Kim, S., Park, Y., Lee, K., Bae, J. (2017). Antimicrobial peptide-loaded gold nanoparticle-DNA aptamer conjugates as highly effective antibacterial therapeutics against Vibrio vulnificus. *Scientific Reports*, 7(1), 13572. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14127-z>
- Libardo, D. M. D., Cervantes, P. J. L., Salazar, P. J. C., & Angeles-Boza, A. M. (2017). Improved Bioactivity of Antimicrobial Peptides by Addition of Amino-Terminal Copper and Nickel (ATCUN) Binding Motifs, 9(8), 1–23. <https://doi.org/10.1007/s00210-015-1172-8>.The
- Libardo, M. D. J., Gorbatyuk, V. Y., & Angeles-Boza, A. M. (2016). Central Role of the Copper-Binding Motif in the Complex Mechanism of Action of Ixosin: Enhancing Oxidative Damage and Promoting Synergy with Ixosin B. *ACS Infectious Diseases*, 2(1), 71–81. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00140>
- Lin, Y., Watson, K. A., Fallbach, M. J., Ghose, S., Smith, J. G., Delozier, D. M., Cao, W.,

- Crooks, R. E., Connell, J. W. (2009). Rapid, solventless, bulk preparation of metal nanoparticle-decorated carbon nanotubes. *ACS Nano*, 3(4), 871–884. <https://doi.org/10.1021/nn8009097>
- Liu, Y., Williams, M. G., Miller, T. J., & Teplyakov, A. V. (2016). Nanoparticle layer deposition for highly controlled multilayer formation based on high-coverage monolayers of nanoparticles. *Thin Solid Films*, 598, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2015.11.082>
- Liu, Y., Ramarao, N., Miller, T., Hadjipanayis, G., & Teplyakov, A. V. (2013). Controlling Physical Properties of Iron Nanoparticles during Assembly by “Click Chemistry.” *The Journal of Physical Chemistry*, 117, 19974–19983. <https://doi.org/10.1021/jp406021z>
- Lorber, B., Bailly, M., Kern, D., & Fischer, F. (2012). Protein Analysis by Dynamic Light Scattering : Methods and Techniques for Students z, 40(6), 372–382. <https://doi.org/10.1002/bmb.20644>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)
- Michalak, G., Głuszek, K., Piktel, E., Deptuła, P., Puszkarz, I., Niemirowicz, K., & Bucki, R. (2016). Polymeric nanoparticles a novel solution for delivery of antimicrobial agents. *Medical Studies*, 1, 56–62. <https://doi.org/10.5114/ms.2016.58807>
- Mishra, B., Reiling, S., Zarena, D., & Wang, G. (2017). Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. *Current Opinion in Chemical Biology*, 38, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.014>
- Mock, J. J., Smith, D. R., & Schultz, S. (2003). Local Refractive Index Dependence of Plasmon Resonance Spectra from Individual Nanoparticles. *Nano Letters*, 3, 485–491. <https://doi.org/10.1021/nl0340475>
- Mulvaney, P. (1996). Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles, *Langmuir*, (12), 788–800. <https://doi.org/10.1021/la9502711>
- Murray, C. B., Kagan, C. R., & Bawendi, M. G. (2000). Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystal assemblies. *Annual Review of Materials Research*, 30(1), 545–610. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.30.1.545>
- Nagy, A., Harrison, A., & Dutta, P. K. (2011). Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes : release of silver ions and mechanism of antibacterial action. *Int J Nanomedicine*, 6, 1833–1852. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24019>
- Naylor, N. R., Atun, R., Zhu, N., Kulasabanathan, K., Silva, S., Chatterjee, A., Knight G. M., Robotham, J. V. (2018). Estimating the burden of antimicrobial resistance : a systematic literature review. *Antimicrob Resist Infect Control*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0336-y>
- Nikalje, A. P. (2015). Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Medicinal Chemistry*, 5(2), 81–89. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000247>
- Nordström, R., & Malmsten, M. (2017). Delivery systems for antimicrobial peptides. *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 242). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.01.005>
- Owen, T. (1996). *Fundamentals of UV-visible spectroscopy*. Germany, Hewlett-Packard.

- Pal, I., Brahmkhatri, V. P., Bera, S., Bhattacharyya, D., Quirishi, Y., Bhunia, A., & Atreya, H. (2016). Enhanced stability and activity of an antimicrobial peptide in conjugation with silver nanoparticle. *Journal of Colloid and Interface Science*, 483, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.08.043>
- Pal, S., Mitra, K., Azmi, S., Ghosh, J. K., & Chakraborty, T. K. (2011). Towards the synthesis of sugar amino acid containing antimicrobial noncytotoxic CAP conjugates with gold nanoparticles and a mechanistic study of cell disruption. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9(13), 4806–4810. <https://doi.org/10.1039/c1ob05338h>
- Pelgrift, R. Y., & Friedman, A. J. (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13–14), 1803–1815. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011>
- Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance, *J Appl Microbiol*, 92, 55–64. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.8.x>
- Porter, A. L., & Youtie, J. (2009). How interdisciplinary is nanotechnology? *Journal of Nanoparticle Research*, 11(5), 1023–1041. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9607-0>
- Rahme, K., Chen, L., Hobbs, R. G., Morris, M. A., O'Driscoll, C., & Holmes, J. D. (2013). Correction: PEGylated gold nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions. *RSC Advances*, 7(15), 8798–8799. <https://doi.org/10.1039/C7RA90006F>
- Rai, A., Pinto, S., Velho, T. R., Ferreira, A. F., Moita, C., Trivedi, U., Evangelista, M., Comune, M., Rumbaugh, K. P., Simões, P. N., Moita, L., Ferreira, L. (2016). One-step synthesis of high-density peptide-conjugated gold nanoparticles with antimicrobial efficacy in a systemic infection model. *Biomaterials*, 85, 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.051>
- Rajchakit, U., & Sarojini, V. (2017). Recent Developments in Antimicrobial-Peptide-Conjugated Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, 28(11), 2673–2686. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00368>
- Rana, S., Yeh, Y. C., & Rotello, V. M. (2010). Engineering the nanoparticle-protein interface: Applications and possibilities. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(6), 828–834. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.001>
- Ravindran, A., Chandran, P., & Khan, S. S. (2013). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Biofunctionalized silver nanoparticles : Advances and prospects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 342–352. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.036>
- Rosen, J. E., Yoffe, S., Meerasa, A., Verma, M., & Gu, F. X. (2011). Nanotechnology and Diagnostic Imaging : New Advances in Contrast Agent Technology. *Journal of Medicine & Nanotechnology*, 2(5). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000115>
- Ruckenstein, E., & Li, Z. F. (2005). Surface modification and functionalization through the self-assembled monolayer and graft polymerization. *Advance in Colloid and Interface Science*, 113, 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2004.07.009>
- Ruden, S., Hilpert, K., Berditsch, M., Wadhvani, P., & Ulrich, A. S. (2009). Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3538–3540. <https://doi.org/10.1128/AAC.01106-08>
- Salazar-González, J. A., González-Ortega, O., & Rosales-Mendoza, S. (2015). Gold nanoparticles and vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 14(9), 1197–1211. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1064772>

- Samanta, B., Yan, H., Fischer, N. O., Shi, J., Jerry, D. J., & Rotello, V. M. (2008). Protein-passivated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: low toxicity and rapid heating for thermal therapy. *Journal of Materials Chemistry*, 18(11), 1204. <https://doi.org/10.1039/b718745a>
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1–2), 55–70. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00200-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00200-X)
- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>
- Singh, S., Papareddy, P., Mörgelin, M., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2014). Effects of PEGylation on membrane and lipopolysaccharide interactions of host defense peptides. *Biomacromolecules*, 15(4), 1337–1345. <https://doi.org/10.1021/bm401884e>
- Smith, B. C. (2011). Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy. New York, Taylor & Francis Group.
- Socaci, C., Magerusan, L., Nan, A., & Turcu, R. P. (2013). Magnetite nanoparticles coated with alkyne-containing polyacrylates for click chemistry. *Journal of Nanoparticle Research*, (April 2015). <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1747-6>
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering : a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- Stones, D. H., Al-Saedi, F., Vaz, D., Perez-Soto, N., & Krachler, A. M. (2015). Biomimetic Materials to Characterize Bacteria-host Interactions. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, (105). <https://doi.org/10.3791/53400>
- Templeton, A. C., Wuelfing, W. P., & Murray, R. W. (2000). Monolayer-Protected Cluster Molecules. *Acc. Chem. Res.*, 33(1), 27–36. <https://doi.org/10.1021/ar9602664>
- Thorek, D. L. J., Elias, D. R., & Tsourkas, A. (2009). Comparative analysis of nanoparticle-antibody conjugations: Carbodiimide versus click chemistry. *Molecular Imaging*, 8(4), 221–229. <https://doi.org/10.2310/7290.2009.00021>
- Tsourkas, A., Shinde-patil, V. R., Kelly, K. A., Patel, P., Wolley, A., Allport, J. R., & Weissleder, R. (2005). In Vivo Imaging of Activated Endothelium Using an Anti-VCAM-1 Magneto-optical Probe, *Bioconjug Chem*, 16, 576–581. <https://doi.org/10.1021/bc050002e>
- Vishwakarma, K., Vishwakarma, O. P., & Bhatele, M. (2013). A Brief Review on Role of Nanotechnology in Medical Sciences. *Lecture Notes in Bioengineering*, 53–63. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-0970-6>
- Wang, L., & Hu, C. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles : present situation and prospects for the future, *Int J Nanomedicine*, 1227–1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
- Wang, Z. L. (2000). Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies, *J. Phys. Chem. B*, 104 (6), 1153–1175. <https://doi.org/10.1021/jp993593c>
- Warheit, D. B., Reed, K. L., & Sayes, C. M. (2009). A role for nanoparticle surface reactivity in facilitating pulmonary toxicity and development of a base set of hazard assays as a component of nanoparticle risk management. *Inhalation Toxicology*, 21, 61–67. <https://doi.org/10.1080/08958370902942640>
- Williams, M. G., & Teplyakov, A. V. (2016). Building high-coverage monolayers of covalently bound magnetic nanoparticles. *Applied Surface Science*, 388, 461–467.

- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389–395.  
<https://doi.org/10.1038/415389a>
- Zdrojewicz, Z., Waracki, M., Bugaj, B., Pypno, D., Cabala, K.,(2015). Medical applications of nanotechnology. *Postepy Hig Med Dosw*, 69, 1196–1204.
- Zhang, M. X., Huang, B. H., Sun, X. Y., & Pang, D. W. (2010). Clickable gold nanoparticles as the building block of nanobioprobes. *Langmuir*, 26(12), 10171–10176.  
<https://doi.org/10.1021/la100315u>
- Zhang, X., & Cresswell, M. (2016). *Inorganic controlled release Materials and Concepts Formulation*. Oxford, Elsevier.

### 7.1. Cálculo de la desviación estándar

Síntesis de AgNPs usando 0.8 mM de AgNO<sub>3</sub> y tiempo de reacción 20 min

Datos de longitud de onda en la máxima absorbancia: 418, 432, 420.5, 425, 430.5 y 421 nm

$$\lambda_{\text{máx promedio}} = \frac{418+432+420.5+425+430.5+421}{6} = 424.5 \text{ nm}$$

$$\text{Desviación estándar de } \lambda_{\text{máx promedio}} = \sqrt{\frac{418^2 + 432^2 + 420.5^2 + 425^2 + 430.5^2 + 421^2}{6} - 424.5^2} = 5.2$$

Datos de la absorbancia máxima: 1.828, 1.158, 1.086, 1.016, 0.835, 0.613

Absorbancia máxima promedio = 1.1

Desviación estándar de la Absorbancia máxima = 0.4

Datos del FWHM: 96, 116, 117, 108, 133, 95 nm

FWHM promedio = 111 nm

Desviación estándar = 13.1



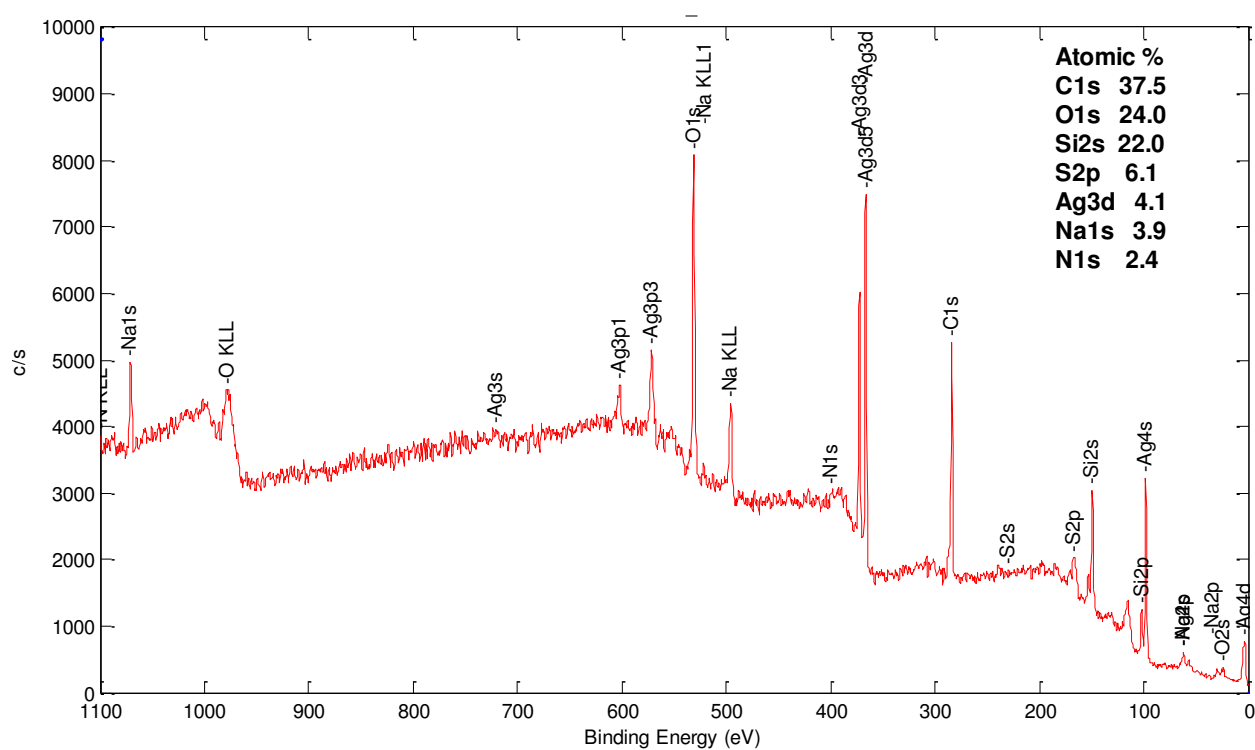
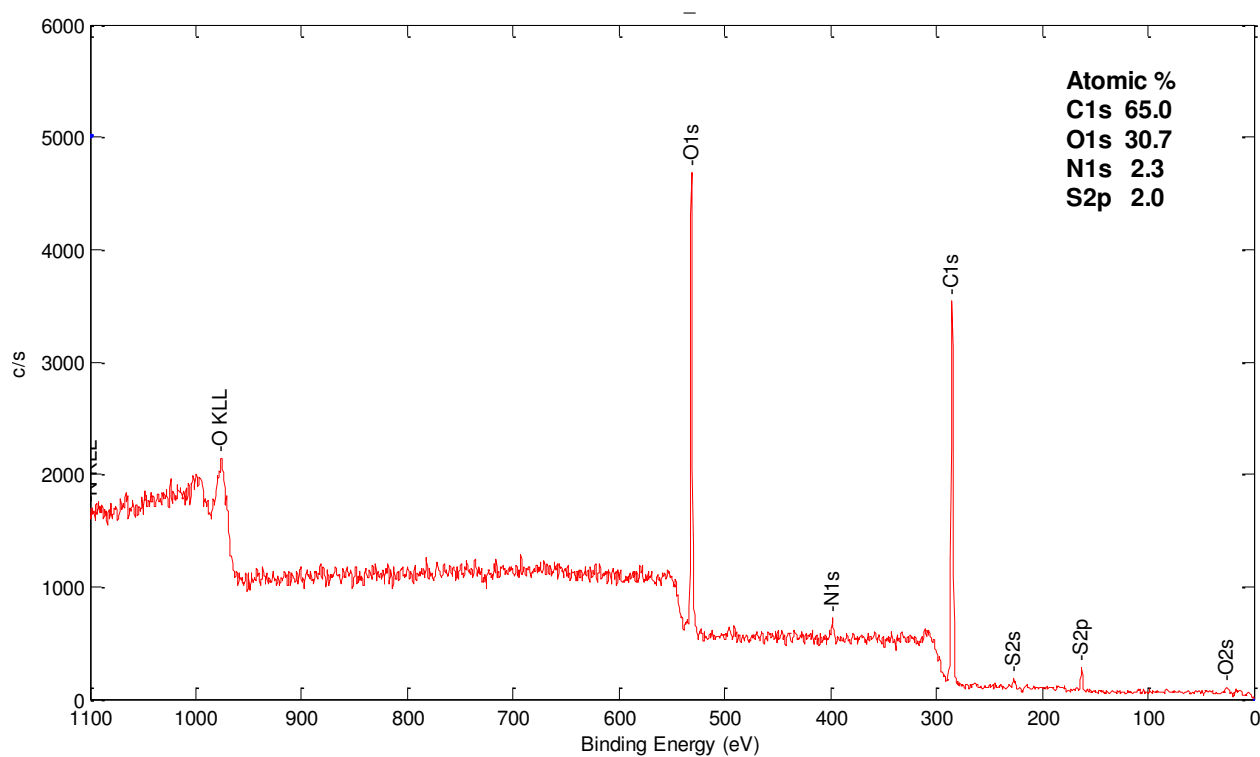


Figura 26. Espectro XPS de AgNPs

Figura 27. Espectro XPS de SH-PEG-N<sub>3</sub>

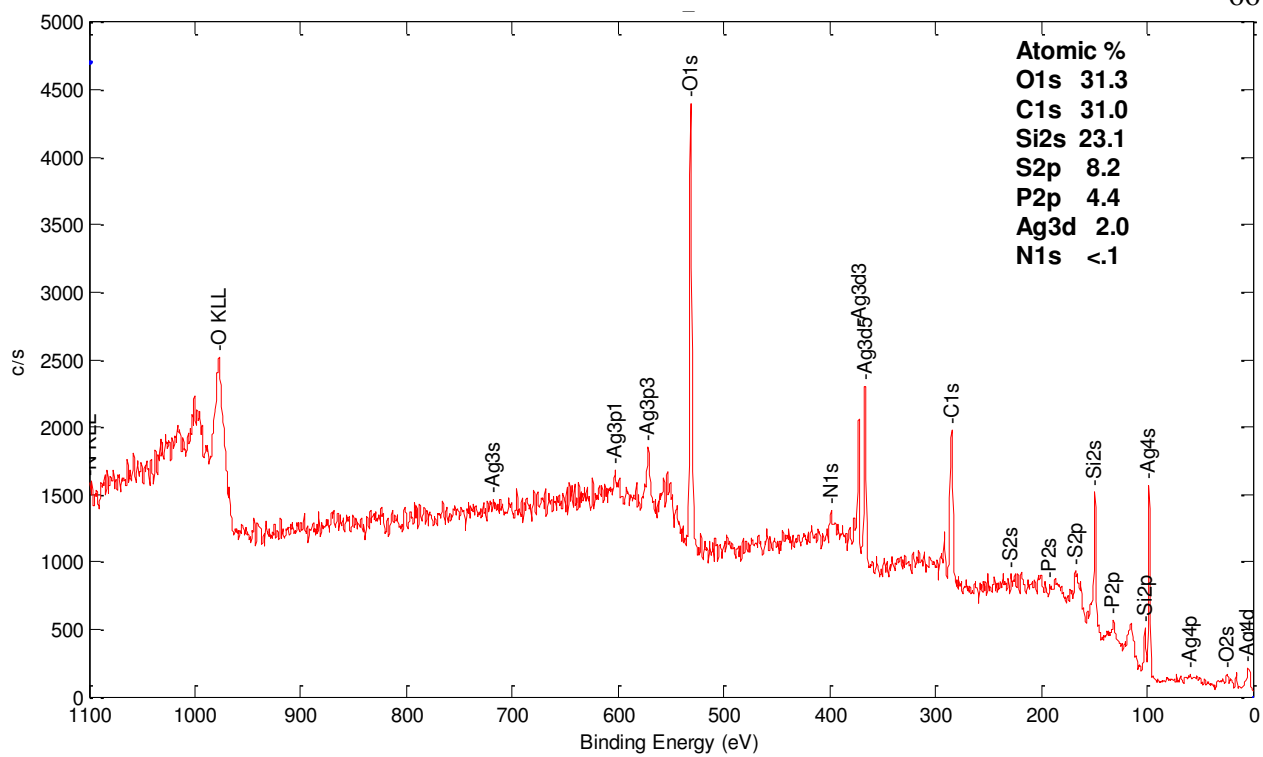


Figura 28. Espectro XPS del péptido

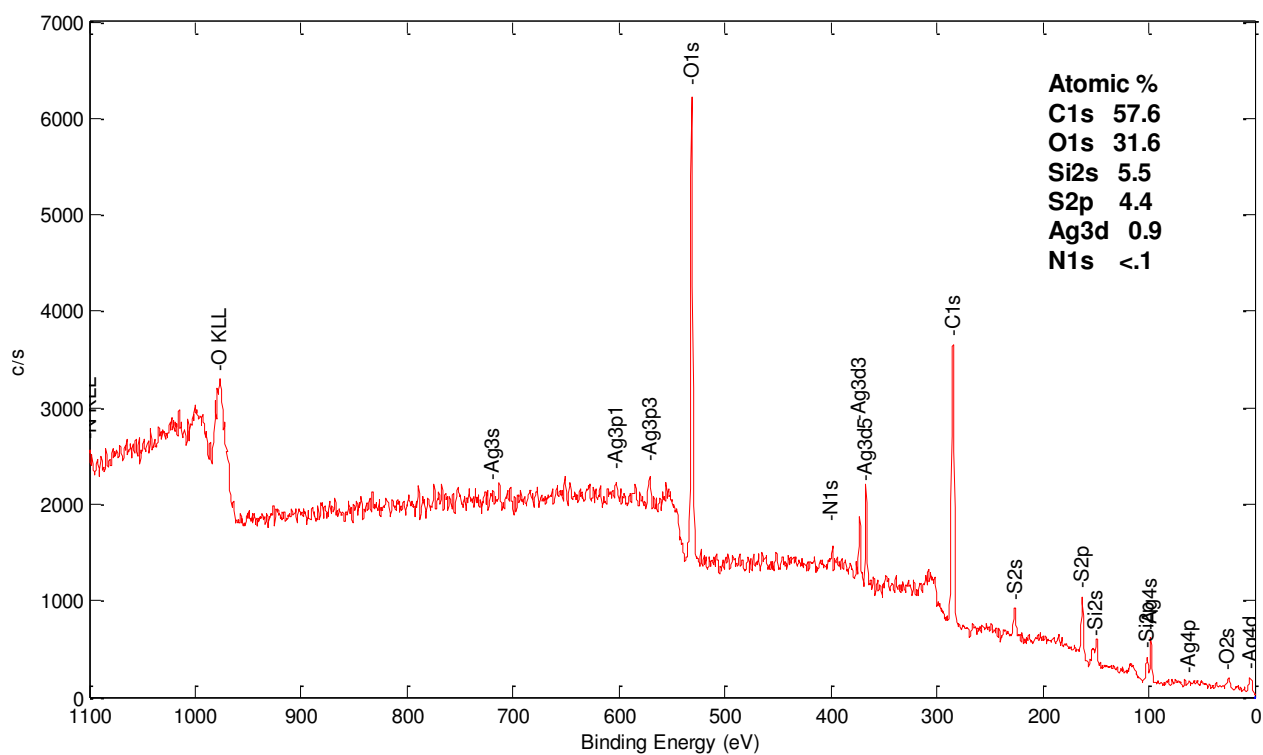


Figura 29. Espectro XPS de AgNPs-S-PEG-N<sub>3</sub>

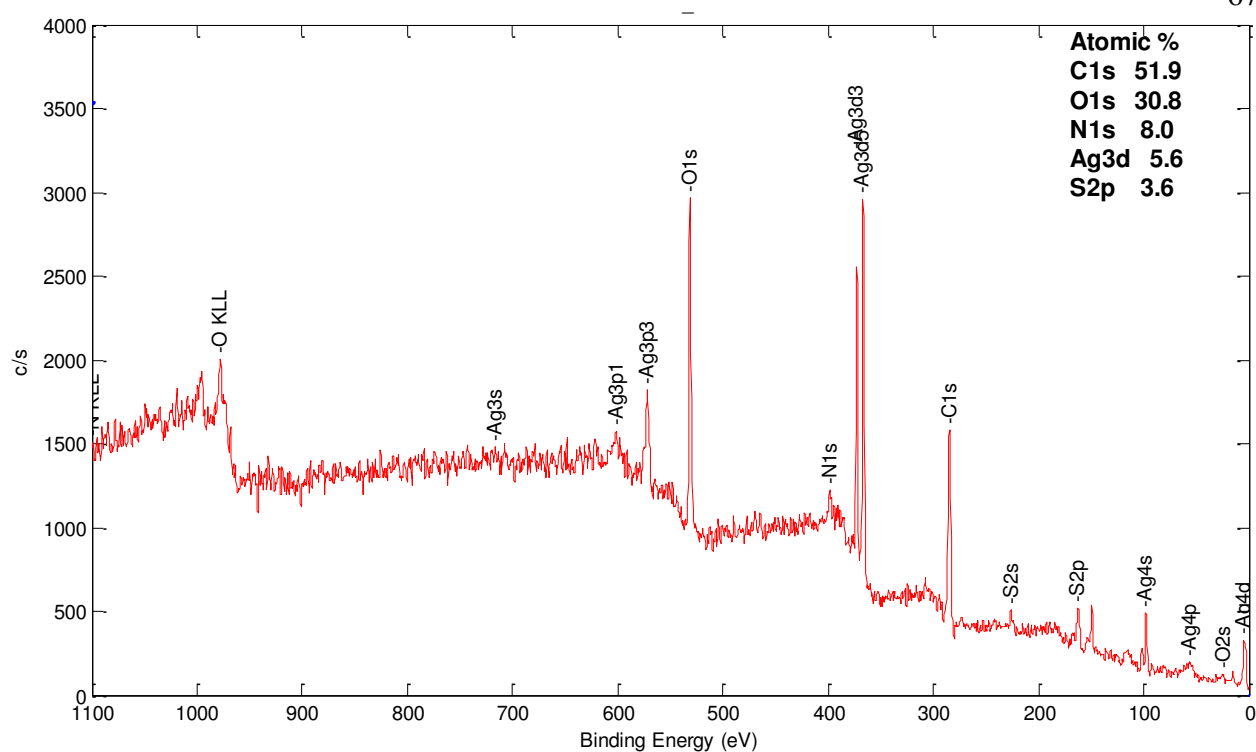


Figura 30. Espectro XPS de AgNPs-S-PEG-VIH

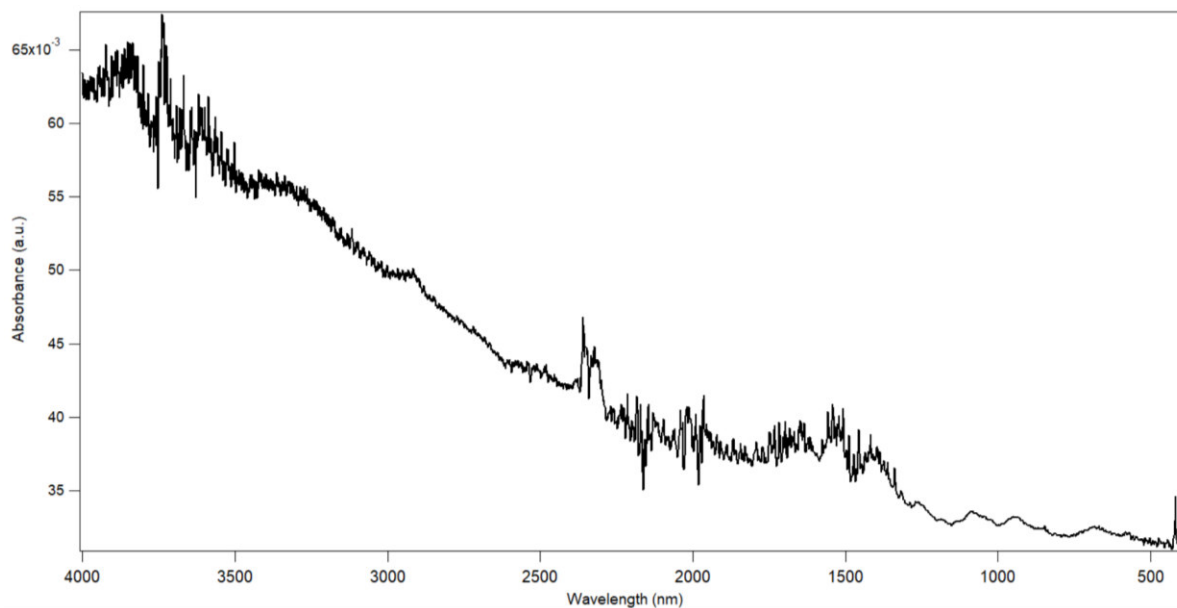
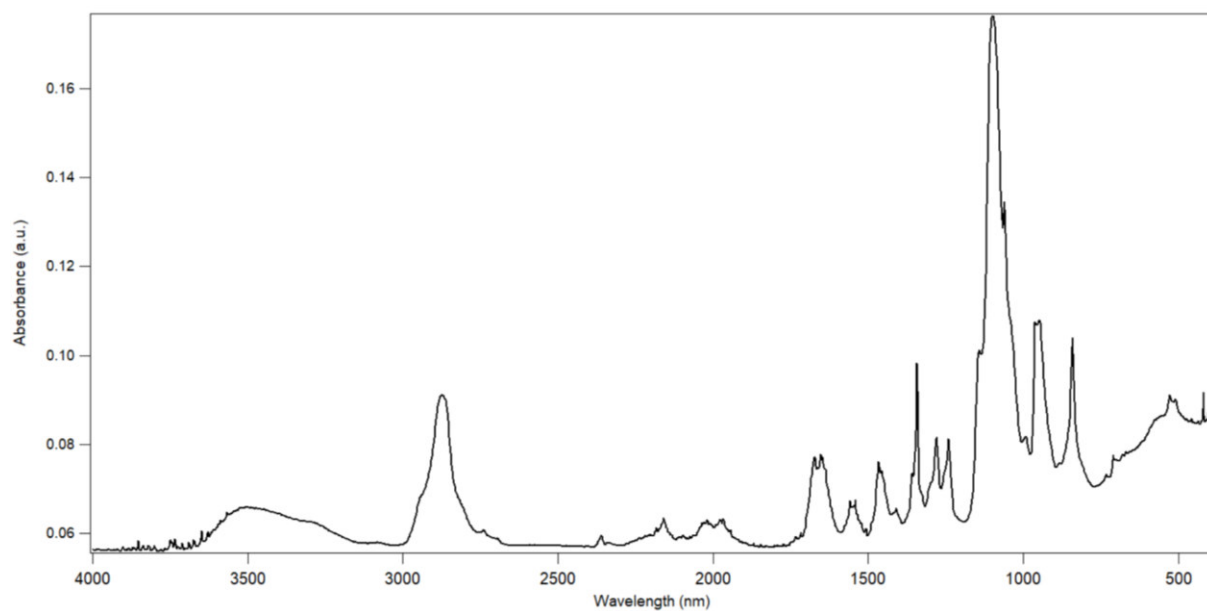
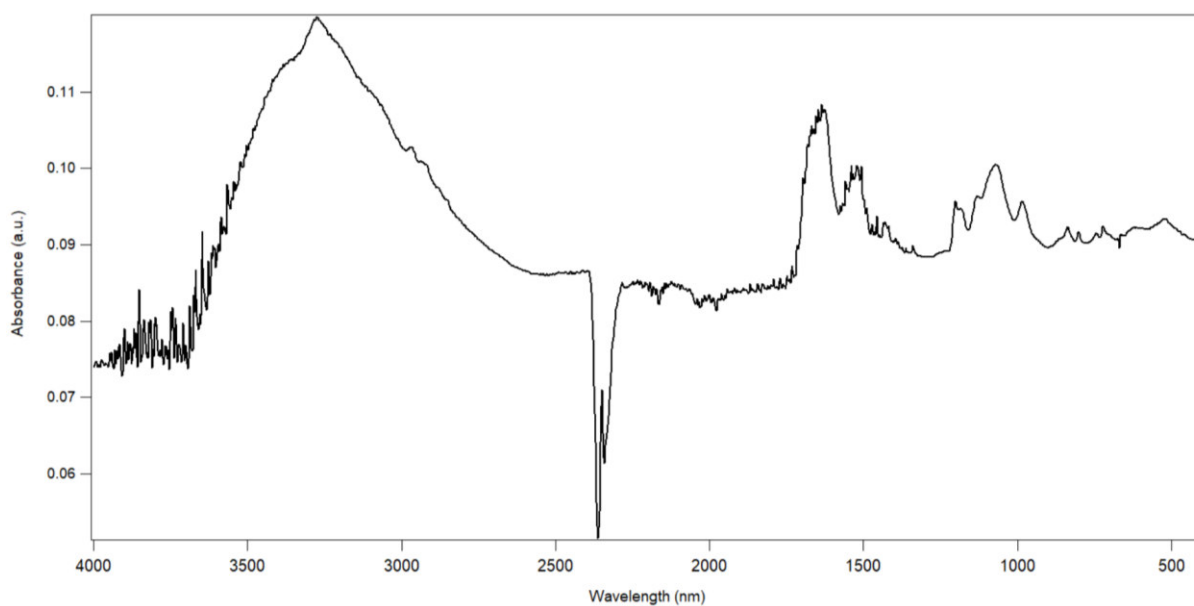


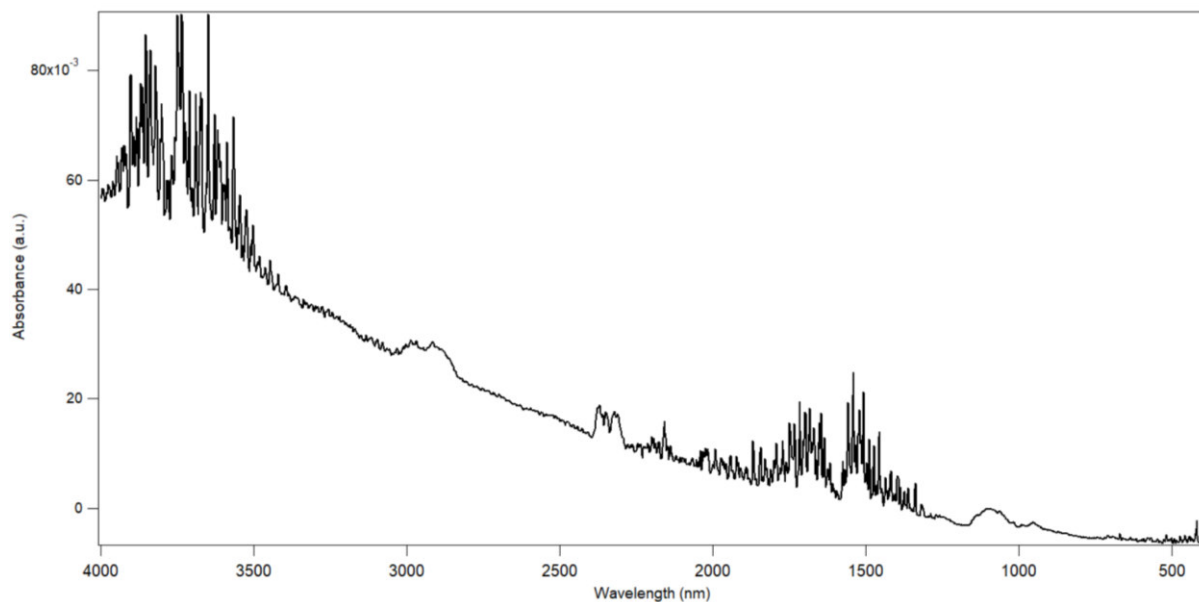
Figura 31. Espectro IR de AgNPs



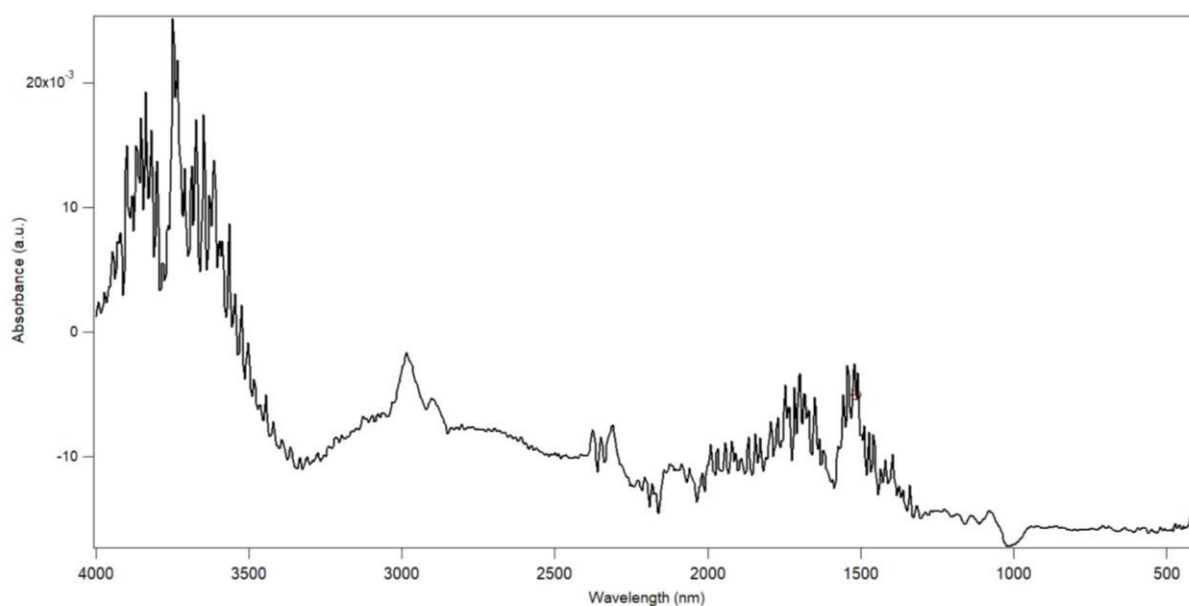
**Figura 32.** Espectro IR de SH-PEG-N<sub>3</sub>



**Figura 33.** Espectro IR del péptido



**Figura 34.** Espectro IR de AgNPs-S-PEG-N<sub>3</sub>

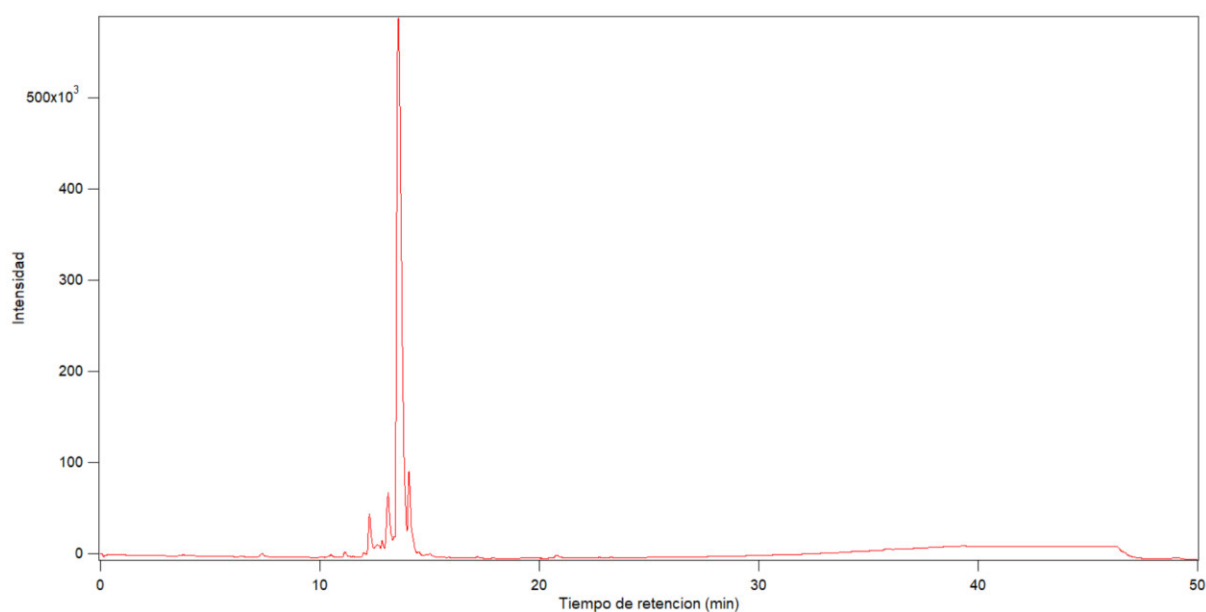


**Figura 35.** Espectro IR de AgNPs-S-PEG-VIH

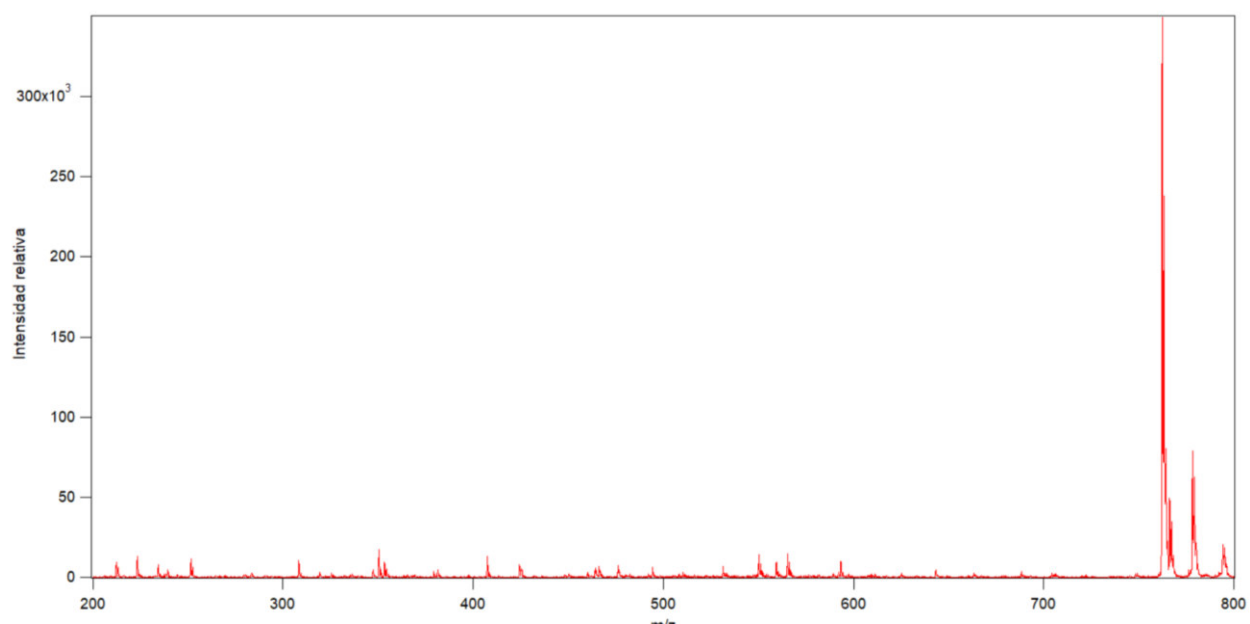
### 7.3. Síntesis y caracterización del péptido VIHGW-alquino-G-NH<sub>2</sub>

La síntesis y purificación en fase sólida se realizaron utilizando protocolos estándares para la química de Fmoc en resina de amida Rink como se describió anteriormente (Libardo et al., 2014). Después de la escisión de los péptidos de resina, los productos se purificaron usando

cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Shimadzu LC-20AD) con una columna C18 70 (Grace Davidson, Deerfield, IL). Las masas se confirmaron mediante espectrometría de masas utilizando ionización por electropulverización como fuente de iones y un analizador de masas de cuadrupolo. Las fracciones que contenían el producto purificado se consolidaron y se liofilizaron durante la noche y se disolvieron en 1: 1 nanopure-agua: acetonitrilo. Los péptidos se almacenaron a 4°C hasta su uso.



**Figura 36.** Espectro HLPC del péptido VIHGW-alquino-G-NH<sub>2</sub> (Proporcionado por el grupo de investigación del PhD Angeles-Boza de la Universidad de Connecticut).



**Figura 37.** Espectro de masas del péptido VIHGW-alkyno-G-NH<sub>2</sub> (Proporcionado por el grupo de investigación del PhD Angeles-Boza de la Universidad de Connecticut).